



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

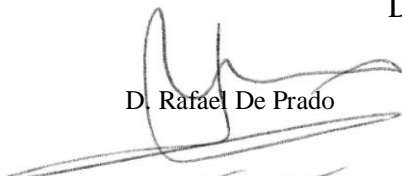
Departamento de Química Agrícola y Edafología

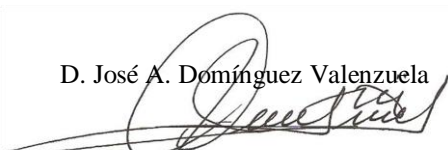
Aspectos agronómicos, biológicos y moleculares de biotipos resistentes al herbicida glifosato.

Tesis Doctoral

FIDEL GONZÁLEZ-TORRALVA

Directores


D. Rafael De Prado
Universidad de Córdoba
España


D. José A. Domínguez Valenzuela
Universidad Autónoma Chapingo
México

Córdoba, Julio de 2012

TITULO: *ASPECTOS AGRONÓMICOS, BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE
BIOTIPOS RESISTENTES AL HERBICIDA GLIFOSATO.*

AUTOR: *FIDEL GONZÁLEZ TORRALVA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS

**Aspectos agronómicos, biológicos y
moleculares de biotipos resistentes al herbicida
glifosato.**

DOCTORANDO:

FIDEL GONZÁLEZ-TORRALVA

LOS DIRECTORES DE LA TESIS INFORMAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Aspectos agronómicos, biológicos y moleculares de biotipos resistentes al herbicida glifosato.”, constituye la memoria que presenta D. Fidel González-Torralva para aspirar al grado de Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias siendo realizado en el laboratorio del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba, bajo nuestra dirección y supervisión. Consideramos que el doctorando cumple los requisitos legales para optar al grado de Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias.

Trabajos publicados relacionados con la tesis:

- **González-Torralva, F.**, Cruz-Hipolito, H., Bastida, F., Mülleder, N., Smeda, R.J. & De Prado, R. (2010). Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4361-4366.
- **González-Torralva, F.**, Rojano-Delgado, A.M., Luque de Castro, M.D., Mülleder, N. & De Prado, R. (2012). Two non-target mechanisms are involved in glyphosate resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *Journal of Plant Physiology* DOI: 10.1016/j.jplph.2012.06.014.
- **González-Torralva, F.**, Gil-Humanes, J., Barro, F., Brants I. & De Prado, R. (2012). Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 16-22.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, Julio de 2012

Directores

D. Rafael De Prado



Universidad de Córdoba, España

D. José A. Domínguez Valenzuela



Universidad Autónoma Chapingo,
México

Índice

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Malas hierbas	3
1.1. Importancia de las malas hierbas.....	3
1.2. Características biológicas de las malas hierbas	4
1.3. Daños causados por las malas hierbas	6
1.4. Métodos de control de malas hierbas.....	7
1.4.1. Métodos físicos para el control de malas hierbas	9
1.4.2. Métodos culturales para el control de malas hierbas	13
1.4.3. Control biológico de malas hierbas	15
1.4.4. Control químico de malas hierbas	16
1.5. Referencias.....	21
CAPÍTULO II.....	25
SUSCEPTIBILIDAD DIFERENCIAL AL HERBICIDA GLIFOSATO	
ENTRE ESPECIES DE <i>Conyza</i> PRESENTES EN ESPAÑA	25
Resumen	27
Abstract	29
2. INTRODUCCIÓN	31
2.1. <i>Objetivos</i>	33
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.2.1. <i>Herbicidas</i>	34
2.2.2. <i>Material vegetal y condiciones de crecimiento</i>	34
2.2.3. <i>Ensayos de dosis-respuesta</i>	34
2.2.4. <i>Ensayos de retención foliar</i>	35
2.2.5. <i>Ensayos de ángulo de contacto</i>	36
2.2.6. <i>Acumulación de ácido shiquímico</i>	36
2.2.7. <i>Ensayos de absorción y translocación de ¹⁴C-glifosato</i>	37

2.2.8. <i>Phosphor imaging</i>	38
2.2.9. <i>Ensayos de campo</i>	38
2.2.10. <i>Análisis estadístico</i>	39
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
2.3.1. <i>Ensayos de dosis-respuesta</i>	40
2.3.2. <i>Ensayos de retención foliar y ángulo de contacto</i>	41
2.3.3. <i>Acumulación de ácido shiquímico</i>	44
2.3.4. <i>Absorción y translocación de ¹⁴C-glifosato</i>	46
2.3.5. <i>Phosphor imaging</i>	48
2.3.6. <i>Ensayos de campo</i>	49
2.4. CONCLUSIONES.....	51
2.5. REFERENCIAS	53
CAPÍTULO III	57
<i>MECANISMOS DE RESISTENCIA INVOLUCRADOS EN C. canadensis L. Cronq. RESISTENTE A GLIFOSATO</i>	57
Resumen	59
Abstract	61
3. INTRODUCCIÓN	62
3.1. <i>Objetivos</i>	64
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.2.1. <i>Herbicidas</i>	65
3.2.2. <i>Material vegetal y condiciones de crecimiento</i>	65
3.2.3. <i>Evaluación de las diferentes poblaciones (Screening)</i>	66
3.2.4. <i>Ensayos dosis-respuesta</i>	66
3.2.5. <i>Ensayos de acumulación de ácido shiquímico</i>	67
3.2.6. <i>Ensayos de retención foliar</i>	67
3.2.7. <i>Absorción y translocación de ¹⁴C-glifosato</i>	68
3.2.8. <i>Visualización del ¹⁴C-glifosato</i>	69
3.2.9. <i>Ensayos de metabolismo</i>	69

3.2.10. Análisis estadístico	70
3.3. RESULTADOS	72
3.3.1. Evaluación de las diferentes poblaciones (Screening)	72
3.3.2. Ensayos dosis-respuesta con los biotipos seleccionados ..	73
3.3.3. Acumulación de ácido shiquímico	73
3.3.4. Ensayos de retención Foliar.....	75
3.3.5. Absorción y translocación de ¹⁴ C-glifosato	75
3.3.6. Visualización del ¹⁴ C-glifosato	79
3.3.7. Metabolismo de glifosato	81
3.4. DISCUSIÓN	84
3.5. REFERENCIAS	87
CAPÍTULO IV.....	95
<i>ALTERNATIVAS QUÍMICAS EN EL CONTROL DE C. canadensis L.</i>	
<i>Cronq. RESISTENTE A GLIFOSATO.....</i>	<i>95</i>
Resumen	97
Abstract	99
4. INTRODUCCIÓN	100
4.1. Objetivos	101
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	102
4.2.1. Generalidades de los ensayos de campo.....	102
4.2.1.1. Evaluación visual	102
4.2.1.2. Evaluación cuantitativa	103
4.2.2. Año 2009 cítricos	103
4.2.3. Año 2010 olivar	106
4.2.4. Año 2012 cítricos	108
4.3. RESULTADOS	111
4.3.1. Año 2009 cítricos	111
4.3.1.1. Evaluación visual	111
4.3.1.2. Evaluación cuantitativa	115

4.3.2. Año 2010 olivar	117
4.3.2.1. Evaluación visual	117
4.3.2.2. Evaluación cuantitativa	119
4.3.3. Año 2012 cítricos	121
4.3.3.1. Evaluación visual	121
4.3.3.2. Evaluación cuantitativa	123
4.4. DISCUSIÓN	125
4.5. REFERENCIAS	128
ANEXO I.....	130
<i>FOTOGRAFÍAS REPRESENTATIVAS DE LOS ENSAYOS DE CAMPO</i>	<i>130</i>
Año 2009 Cítricos	132
Año 2010 Olivar	134
Año 2012 Cítricos	136
ANEXO II.....	138
<i>PUBLICACIONES</i>	<i>138</i>
ANEXO III.....	184
<i>C. bonariensis, C. canadensis y C. sumatrensis</i>	<i>184</i>

Índice de Figuras

Capítulo II

Figura 2- 1. Acumulación de ácido shiquímico en plantas de *Conyza* spp. sensibles después de la aplicación de glifosato a 200 g ia ha^{-1} . Barras verticales representan (\pm) el error estándar de las medias. -----45

Figura 2- 2. Imágenes representativas demostrando la translocación de ^{14}C -glifosato en plantas de *C. sumatrensis* (a), *C. bonariensis* (b) y *C. canadensis* (c). Las imágenes fueron tomadas a 96 h después del tratamiento; la intensidad del color rojo indica mayor concentración de glifosato. Las flechas (abajo) indican la hoja tratada. -----49

Capítulo III

Figura 3- 1. Reducción del peso fresco en 25 poblaciones de *C. canadensis* 3 semanas después de la aplicación de glifosato a una dosis de 238 g ae ha^{-1} en el estadio BBCH 14-15. Las barras verticales corresponden al error estándar. -----72

Figura 3- 2. Curva dosis-respuesta de *C. canadensis* sensible (S) y resistente (R) al herbicida glifosato, tratados en el estadio de crecimiento BBCH 14-15. Los datos fueron obtenidos 21 días después del tratamiento. Barras verticales \pm error estándar de la media.-----73

Figura 3- 3. Acumulación de ácido shiquímico en biotipos susceptibles y resistentes de *C. canadensis* a 24, 48, 72, 96 y 168 h después de la aplicación de glifosato a una dosis de 200 g ae ha^{-1} . Para cada tiempo, los valores medios mostrando la misma letra no son estadísticamente diferente de acuerdo al análisis de varianza unifactorial. Barras verticales \pm error estándar de las medias.-----74

Figura 3- 4. Absorción de ^{14}C -glifosato en biotipos S y R de *C. canadensis* a través del tiempo. Ambos biotipos no difirieron

estadísticamente en la absorción del herbicida de acuerdo al análisis de varianza. Barras verticales \pm error estándar de las medias. -----	76
Figura 3- 5. Imágenes representativas donde se observa el movimiento de ^{14}C -glifosato en biotipos S (A) y R (B) de <i>C. canadensis</i> a 96 h después del tratamiento. Una coloración roja de mayor intensidad indica mayor concentración de ^{14}C -glifosato. Las flechas (arriba) indican el sitio de aplicación del ^{14}C -glifosato. -----	80
Figura 3- 6. Electroferogramas obtenidos de los biotipos S (A) y R (B) de <i>C. canadensis</i> tratados con glifosato a la dosis de 200 g ae ha^{-1} , 96 h después del tratamiento. GLYP: glifosato; GLYOX: glioxilato; AMPA: ácido aminometilfosfónico; SARCOS; sarcosina. -----	82

Capítulo IV

Figura 4- 1. Evaluaciones visuales (%) de los distintos tratamientos herbicidas en Navas de la Grulla. Año 2009.-----	113
Figura 4- 2. Peso seco por m^2 de los diferentes tratamientos herbicidas realizados sobre <i>Conyza</i> spp. a 60 días después del tratamiento en la finca Navas de la Grulla. Año 2009.-----	115

Índice de Tablas

CAPÍTULO I

Tabla 1- 1. Clasificación de los herbicidas según el sitio de acción (HRAC, 2012)..... 18

CAPÍTULO II

Tabla 2- 1. Parámetros del modelo^a usado para calcular la dosis requerida de glifosato para causar el 50% (ED₅₀) de daño en plantas de *Conyza* spp. en el estadio de roseta (BBCH 14-15)..... 40

Tabla 2- 2. Parámetros del modelo^a usado para calcular la dosis requerida de glifosato para causar el 50% (ED₅₀) de daño en plantas de *Conyza bonariensis* en tres diferentes estadios de crecimiento..... 19

Tabla 2- 3. Retención foliar y ángulo de contacto en las tres especies de *Conyza* spp., tratadas en el estadio de roseta (BBCH 14-15). 44

Tabla 2- 4. Absorción y translocación de ¹⁴C-glifosato en *Conyza* spp. a 96 h después del tratamiento..... 47

Tabla 2- 5. Peso seco de la biomasa de *C. bonariensis* y *C. canadensis* en diferentes estadios de crecimiento en la finca de olivar utilizada para los ensayos de campo^a. 50

CAPÍTULO III

Tabla 3- 1. Translocación de ¹⁴C-glifosato en los biotipos R y S de *C. canadensis*. El tratamiento se realizó cuando las plantas alcanzaron el estadio de roseta (BBCH 14-15). 78

Tabla 3- 2. Metabolitos del herbicida glifosato encontrados en plantas S y R de *C. canadensis*. Ambos biotipos fueron tratados en el estadio BBCH 14-15 a una dosis de 200 g ae ha⁻¹. 83

CAPÍTULO IV

Tabla 4- 1. Tratamientos herbicidas aplicados sobre la cubierta vegetal de *Conyza* spp. en la Finca Navas de La Grulla, dosis y abreviatura utilizada en el capítulo IV. Año 2009..... 105

Tabla 4- 2. Tratamientos herbicidas aplicados sobre la cubierta vegetal de *Conyza* spp. en Ferreira, Portugal, dosis y abreviatura utilizada en el capítulo IV. Año 2010. 107

Tabla 4- 3. Diferentes tratamientos aplicados sobre *Conyza* spp. resistente a glifosato en Palma del Río, Córdoba. Año 2012. 109

Tabla 4- 4. Evaluación visual (%) de los distintos tratamientos realizados sobre *Conyza* spp. en la finca Navas de la Grulla. Año 2009. 114

Tabla 4- 5. Peso seco por m² de los diferentes tratamientos herbicidas llevados a cabo sobre *Conyza* spp. a 60 días después del tratamiento en la finca Navas de la Grulla. Año 2009. 116

Tabla 4- 6. Evaluación visual de la eficacia en los distintos tratamientos herbicidas realizados sobre *Conyza* spp. en Ferreira, Portugal. Año 2010. 118

Tabla 4- 7. Peso seco por m² de los diferentes tratamientos herbicidas llevados a cabo sobre *Conyza* spp. a 30 DDA en Ferreira, Portugal. Año 2010. 120

Tabla 4- 8. Eficacia de los diferentes tratamientos aplicados sobre *Conyza* spp. resistente al herbicida glifosato en Palma del Río, Córdoba. Año 2012. 122

Tabla 4- 9. Peso seco por m² de los diferentes tratamientos herbicidas llevados a cabo sobre *Conyza* spp. resistente al herbicida glifosato en Palma del Río, Córdoba. Año 2012. 124

Resumen

Capítulo II

Ensayos de laboratorio e invernadero se llevaron a cabo para investigar las diferencias en susceptibilidad entre tres especies del género *Conyza* introducidas como malas hierbas en España: *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* y *Conyza sumatrensis*. El material vegetal se obtuvo de semillas recolectadas en los cultivos de olivar y cítricos en el sur de España, sin registro ninguno de aplicaciones previas del herbicida glifosato. Las curvas dosis-respuesta mostraron diferentes valores de ED₅₀: 2.9, 15.7 y 34.9 g ia (ingrediente activo) ha⁻¹, respectivamente para *C. sumatrensis*, *C. bonariensis* y *C. canadensis* en el estadio de roseta (6-8 hojas). Diferencias significativas se encontraron entre las tres especies en la retención foliar de herbicida, así como también en el ángulo de contacto. El orden de acuerdo a la retención foliar del herbicida fue *C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*, mientras que los valores medios del ángulo de contacto fueron 59.2, 65.5 y 72.9°, respectivamente. No existieron diferencias significativas entre las tres especies de acuerdo a la absorción foliar de ¹⁴C-glifosato (los valores encontrados fueron desde 37.4% para *C. canadensis* a 52.4% para *C. sumatrensis*) el orden entre las especies fue el mismo que la retención foliar del herbicida. La cantidad de radiactividad translocada de las hojas tratadas fue menor en *C. canadensis* comparada con las otras dos especies (*C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*). Entre todos los resultados de los parámetros estudiados, se ha identificado una susceptibilidad diferencial al herbicida glifosato entre las especies de *Conyza*. Existió una acumulación de ácido shiquímico después de la aplicación de glifosato a la dosis de 200 g ia ha⁻¹. Sin embargo, *C. canadensis* mostró una menor cantidad de ácido shiquímico respecto a las otras dos especies a 168 h después del tratamiento. En *C. bonariensis*, se realizaron estudios en

invernadero para determinar la susceptibilidad al herbicida glifosato en tres estadios diferentes de crecimiento: roseta, elongación del tallo (10-15 cm de altura) y floración. El menor ED₅₀ obtenido fue durante el estadio de roseta (15.7 g ia ha⁻¹), comparado con la elongación del tallo (86.6 g ia ha⁻¹), obteniendo el mayor ED₅₀ durante el estadio de floración (117.5 g ia ha⁻¹); las plantas en un estadio temprano de crecimiento retuvieron una mayor cantidad de glifosato. Los resultados están en concordancia con observaciones en campo donde las plantas más jóvenes son más susceptibles al herbicida glifosato.

Capítulo III

Se realizó la investigación de las bases bioquímicas y fisiológicas de la resistencia y sensibilidad en poblaciones de “hierba de caballo” (*Conyza canadensis* L. Cronq.) colectadas en Córdoba, Huelva, Málaga, Jaén y Sevilla en el sur de España. La aplicación de 238 g ae (ácido equivalente) ha^{-1} de glifosato sobre 25 poblaciones en el estadio de roseta (BBCH 14-15) reveló reducciones del peso fresco desde 9 al 99%. El biotipo resistente (R C004) fue 6.1 veces más resistente que el biotipo susceptible (S). La acumulación de ácido shiquímico en ambos biotipos se incrementó hasta las 72 h después del tratamiento (HDT), continuando el aumento (a un 61.2% respecto al valor máximo) en el biotipo S, pero reduciéndose un 40% en el biotipo R (C004). La retención foliar del herbicida así como la absorción de ^{14}C -glifosato entre los biotipos R y S no tienen ningún efecto en la resistencia a este herbicida. Las pruebas cualitativas y cuantitativas mostraron una mayor translocación de ^{14}C -glifosato en el biotipo S que en el R (C004). El herbicida glifosato fue metabolizado más rápido en el biotipo R (C004) que en el S, desapareciendo por conversión en glioxilato, sarcosina y AMPA dentro de las 96 HDT. Por otro lado, 41.43 nmol g^{-1} de peso fresco de todo el glifosato aplicado permaneció en el biotipo S, siendo el glioxilato el único metabolito no tóxico. Estos resultados sugieren que la resistencia al herbicida glifosato en la “hierba de caballo” es debido a dos mecanismos diferentes fuera del sitio de acción: a) translocación diferente del herbicida y b) el metabolismo del herbicida a otros compuestos.

Capítulo IV

Conyza canadensis es una mala hierba dicotiledónea de gran importancia en cultivos perennes como son olivar y cítricos. Durante los últimos años, se han reportado faltas en el control de esta mala hierba con el herbicida glifosato. Por tal razón, se realizaron ensayos de campo con diferentes mezclas de herbicidas para buscar la mejor solución química en el control de *C. canadensis* resistente a glifosato. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, han mostrado que *C. canadensis* se controla eficazmente en preemergencia mediante el uso de herbicidas como Flumioxazin, Oxyfluorfen, Pendimetalina, Fluometuron-Terbutilazina y Diflufenican los cuales en nuestros ensayos mostraron porcentajes de control elevados. En postemergencia temprana, *C. canadensis* fue controlada eficazmente incrementando la dosis comercial de glifosato a la máxima autorizada. Por otro lado, las mezclas Glifosato + Flazasulfuron; (MCPA + Glifosato); Glifosato + Saflufenacil + Adyuvante y Glifosato + Amitrol mostraron una eficacia mayor del 90%. La utilización de herbicidas quemantes como el diquat también mostró un control eficaz de *C. canadensis*. El control de *C. canadensis* resistente a glifosato debe incluir la rotación de herbicidas, además de la utilización de herbicidas en preemergencia.

Abstract

Chapter II

Greenhouse and laboratory experiments were conducted to investigate differences in glyphosate susceptibility among three species of the genus *Conyza* introduced as weeds in Spain: tall fleabane (*Conyza sumatrensis*), hairy fleabane (*Conyza bonariensis*), and horseweed (*Conyza canadensis*). Plant material was obtained from seeds collected in weed populations growing in olive groves and citrus orchards in southern Spain, with no previous history of glyphosate application. Dose-response curves displayed ED₅₀ values of 2.9, 15.7, and 34.9 g ai ha⁻¹, respectively, for *C. sumatrensis*, *C. bonariensis*, and *C. canadensis* plants at the rosette stage (6-8 leaves). Significant differences were found among the three species in the glyphosate retention on leaves as well as the leaf contact angle. The species order according to glyphosate retention was *C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*, while the mean contact angles of glyphosate droplets were 59.2, 65.5, and 72.9°, respectively. There were no significant differences among species in the absorption of ¹⁴C-glyphosate (ranged from 37.4% for *C. canadensis* to 52.4% for *C. sumatrensis*), but the order among species was the same as glyphosate retention. The amount of radioactivity translocated from treated leaves was lower in *C. canadensis* as compared to the other two species (*C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*). Combined, all of the studied parameters identified differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* species. Each species accumulated shikimate in leaf tissues following application of glyphosate at 200 g ai ha⁻¹. However, *C. canadensis* exhibited lower shikimate levels than the other two species at 168 h after herbicide application. For hairy fleabane, a greenhouse study explored its susceptibility to glyphosate at three developmental stages: rosette, bolting (stem height, 10-15 cm), and flowering. The ED₅₀ was lower at the rosette stage (15.7 g ai ha⁻¹) as compared to bolting (86.6 g ai

ha⁻¹), with the highest ED₅₀ values occurring at flowering (117.5 g ai ha⁻¹); plants at the earlier developmental stage retained more glyphosate. These results agree with field observations that plants at early developmental stages are more sensitive to glyphosate.

Chapter III

The physiological and biochemical basis for glyphosate resistance and susceptibility in horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) populations collected from Córdoba, Huelva, Málaga, Jaén and Seville in southern Spain were investigated. Screening 25 populations treated with glyphosate (238 g ae ha⁻¹) at the rosette stage (BBCH 14–15) revealed reductions in fresh weight (fw) of 9 to 99%. The resistant biotype (R C004) was 6.1 times more resistant than the susceptible biotype (S). Shikimate accumulation in both biotypes increased until 72 h after treatment (HAT) and then continued to increase (to 61.2% respect to the maximum value) in the S biotype but decreased by 40% in the R (C004) biotype. Differential glyphosate spray retention and foliar uptake of applied ¹⁴C-glyphosate between the R (C004) and S biotype had no effect on resistance to this herbicide. Quantitative and qualitative tests showed greater ¹⁴C-glyphosate mobility in the S biotype than in the R (C004) biotype. Glyphosate was metabolized faster in the R (C004) biotype than in the S biotype. The herbicide disappeared completely from the R (C004) biotype by conversion into glyoxylate, sarcosine and AMPA within 96 HAT. On the other hand, 41.43 nmol g⁻¹ fw of all glyphosate applied remained in the S biotype and glyoxylate was its only non-toxic metabolite. These results suggest that glyphosate resistance in horseweed is due to two different non-target mechanisms, namely: (a) impaired glyphosate translocation and (b) glyphosate metabolism to other compounds.

Chapter IV

Conyza canadensis is a very important dicot weed in perennial crops such as olives trees and citrus orchards. During the last years some claims about the low efficacy with herbicide glyphosate have been reported. In order to find the best chemical alternatives to control glyphosate resistant *C. canadensis* field trials were carried out using different herbicides mixtures. The results have shown that *C. canadensis* is perfectly controlled with the use of preemergent herbicides such as Flumioxazin, Oxifluorfen, Pendimethalin, Fluometuron-Terbuthylazine and Diflufenican, which, in our assays showed high control percentages. In early postemergence, *C. canadensis* was controlled using the maximum glyphosate authorized field rate. By other side, the mixtures glyphosate + flazasulfuron; (MCPA + Glyphosate); Glyphosate + Saflufenacil + Adjuvant and Glyphosate + Amitrol showed more than 90% of efficacy in the control of glyphosate resistant *C. canadensis*. Use of burndown herbicides such as diquat showed a great control efficacy on the glyphosate resistant *C. canadensis*. Control of glyphosate resistant *C. canadensis* should include the herbicide rotation and the use of preemergence herbicides.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Malas hierbas

A través de los años, han existido varias definiciones para las malas hierbas o malezas. Entre dichas definiciones la mayoría concurre en que las malas hierbas son plantas “no deseables” y que, por tanto, deben ser destruidas o eliminadas, “fuera de lugar”, “creciendo en donde no son deseadas” que “reducen el crecimiento de otras plantas más útiles”... Sin embargo, una de las definiciones de mala hierba más aceptada es la descrita por Pujadas y Hernández (1988): “*Planta que crece siempre o de forma predominante en situaciones marcadamente alteradas por el hombre y que resulta no deseable por él en un lugar y momento determinado*”.

1.1. Importancia de las malas hierbas

Estimaciones indican que incluso después de las mejores prácticas de gestión, las pérdidas ocasionadas por las malas hierbas en los cultivos superan los \$500 millones anuales (Swanton *et al.*, 1993).

Por otro lado, muchas malas hierbas exóticas plantean importantes amenazas económicas o medio ambientales en todo el mundo, los métodos para evaluar el riesgo potencial de introducción de especies son los componentes clave en el manejo de las invasiones de plantas (Hulme, 2012). Se estima que las malas hierbas introducidas pueden ser responsables de hasta un 40% de las pérdidas económicas a la agricultura (Pimentel *et al.*, 2001).

Tan sólo en el Reino Unido la especie *Fallopia japonica* (Polygonaceae) representó un tercio del costo total anual (165 609 000 £) para su manejo;

es la lista también se encuentran especies difíciles de controlar como *Avena fatua*, *A. sterilis* y *Conyza canadensis* (Williams *et al.*, 2010).

1.2. Características biológicas de las malas hierbas

De las aproximadamente 250 000 especies vegetales que existen alrededor del mundo, solamente un 3% están consideradas como malas hierbas, es decir unas 8 000 especies. Sin embargo, solamente unas 250 son reconocidas como malas hierbas problemáticas en los cultivos, y de estas, 25 están catalogadas como las peores malas hierbas en todo el mundo (Holm *et al.*, 1977; Cobb, 1992).

-Fácil dispersión

Las semillas que producen muchas malas hierbas a veces presentan el tamaño y la forma similares a las semillas de los cultivos en los cuales se desarrollan, un ejemplo es *Avena sterilis* (también llamada “avena loca”) en el cultivo de la cebada (*Hordeum vulgare*) o el de *Cuscuta epithymum* (cúscuta) en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*). En ambos casos la separación entre semillas es complicada.

-Persistencia

-*Elevada producción de semillas.* Bajo condiciones favorables, *Amaranthus retroflexus* (bledo) o *Solanum nigrum* (tomatito) pueden producir 100 000 semillas por planta. En *Conyza canadensis* se ha registrado que una sola planta puede producir hasta 200 000 semillas (Bhowmik y Bekech, 1993).

-*Viabilidad de la semilla.* Este es un aspecto fundamental para la proliferación de las malas hierbas. Las semillas pueden permanecer

viales en el suelo durante muchos años. Son numerosas especies en las cuales las semillas pueden ser viables durante 10 años, esta larga vida aunada a la gran producción de semillas garantiza la existencia de un gran banco de semillas en los suelos agrícolas.

-Germinación escalonada. La mayoría de las malas hierbas producen semillas que germinan a lo largo del año y durante varios años, es decir tienen una germinación escalonada. Lo anterior les garantiza su dispersión a través del tiempo.

-Plasticidad fenotípica. Una característica fundamental de las malas hierbas es la gran rusticidad que presentan, tolerando una gran cantidad de condiciones climáticas adversas y, produciendo aún semillas viables para asegurar la siguiente generación de individuos.

-Plasticidad genotípica. La variabilidad genética que presentan las malas hierbas y su potencial de recombinación les brinda una gran capacidad de adaptación cuando son sometidas a una gran presión de selección, tal es el caso de biotipos resistentes a herbicidas.

-Competencia

Como es sabido las malas hierbas compiten por los diferentes recursos existentes ya sean agua, luz, nutrientes o simplemente espacio. A lo largo del tiempo, las malas hierbas se han adaptado e incluso a dominar ciertas situaciones como son:

Alta densidad: Las elevadas densidades de plantas (gracias a su elevada prolificidad), establecidas en un cultivo les otorga una ventaja competitiva respecto al cultivo.

Nascencia sincronizada: Además de una germinación escalonada de las malas hierbas durante largos periodos de tiempo, algunas especies germinan a la vez que el cultivo principal o incluso antes. Esta situación perjudicará enormemente al cultivo.

Morfología y fisiología: Muchas malas hierbas presentan mecanismos morfológicos o fisiológicos que le otorgan una mayor competitividad respecto al cultivo. Por ejemplo un mayor desarrollo radicular, mayor altura y superficie foliar, en otras especies existe una mayor eficiencia fotosintética o en otros casos se ha registrado la producción de sustancias que reducen o inhiben el crecimiento de otras especies de plantas (alelopatía).

1.3. Daños causados por las malas hierbas

Los daños provocados por las malas hierbas suelen ser de diversa índole. Las causas principales son:

-Reducción del rendimiento del cultivo. A través de la competencia por luz, agua, nutrientes y en algunos casos por la liberación de sustancias dañinas en el medio agrícola.

-Reducen la calidad o el valor del producto final. Por ejemplo la presencia de semillas de malas hierbas en semillas de cultivo que se utilizarán para siembra; leche con un sabor indeseable producida por vacas que han pastado en terrenos con ajillo (*Petiveria alliacea*) que tiene

sabor a ajo o con cebolla silvestre (*Allium* spp.) que tiene sabor y olor a cebolla (García *et al.*, 1975; Barkley, 1983); en el caso del algodón, fibras teñidas por la clorofila presente en las malas hierbas que aún no han muerto en el momento de recogida del mismo; objetos extraños en el grano, tales como semillas, tallos y hojas de malas hierbas.

-Incrementan el costo de las prácticas de control. La limpieza de semillas de malas hierbas en semillas de algún cultivo implican un mayor costo así como también la adquisición de herbicidas para su control o inclusive la mano de obra para el deshierbe manual.

-Sirven de hospederos de plagas y enfermedades. Las malas hierbas suelen ser el hospedante de insectos o enfermedades, los cuales pueden afectar al cultivo con una baja calidad del producto o rendimiento.

-Causan problemas de salud tanto a humanos como animales. Muchas malas hierbas se caracterizan por causar alergias o severas irritaciones en la piel (hiedra venenosa) así como la fiebre del heno causada por el polen de diversas especies de plantas.

-Disminuyen el valor de la tierra. Las malas hierbas pueden causar costos adicionales en la utilización de la tierra para la producción de los cultivos, o en algunos casos hacer que la tierra agrícola sea esencialmente inútil, el valor de la tierra puede verse seriamente reducido por infestaciones severas de malas hierbas (Green *et al.*, 1991).

1.4. Métodos de control de malas hierbas

Las opciones en el manejo de malas hierbas deben ser consideradas antes de llevar a cabo las acciones “correctivas”, debido a que las malas hierbas

usualmente son controladas o contenidas mejor con las practicas que se llevan a cabo antes del establecimiento del cultivo. Una vez que las malas hierbas se han establecido en un campo, raramente pueden ser erradicadas.

Prevención, erradicación y control

La *prevención* incluye procedimientos que inhiben o pueden retrasar el establecimiento de las malas hierbas en áreas donde aún no están habitadas por las mismas. Estas prácticas restringen tanto la introducción, propagación y distribución de las malas hierbas ya sea a nivel local o regional. Las medidas preventivas incluyen las prácticas culturales, tales como la limpieza de las semillas, el cual impide la diseminación de las malas hierbas a nuevos campos de cultivo y las cuarentenas.

La *erradicación* consiste en la eliminación total de las malas hierbas dentro de un campo, área o región. Requiere la completa supresión o remoción de semillas además de las partes vegetativas de las mismas en un área definida. Raramente este objetivo se cumple en áreas grandes ya que se requiere de grandes esfuerzos y tiempo para llevarlo a cabo con éxito.

Las prácticas de *control* reducen o suprimen malas hierbas en un área definida y no necesariamente resulta en la eliminación de cualquier mala hierba en particular.

Para el control de las malas hierbas existen cuatro grandes métodos: físico, cultural, biológico y químico.

1.4.1. Métodos físicos para el control de malas hierbas

Deshierbe

Es el método más antiguo y sencillo del control de malas hierbas. Sin embargo, se estima que más del 70% de los agricultores del mundo, sobre todo en países en desarrollo aún usan azadones u otros implementos para cultivar la tierra.

Aunque los métodos manuales del control de malas hierbas se han reducido en las naciones desarrolladas, el deshierbe manual es aún practicado en ciertos cultivos con un alto valor o cuando no existe la posibilidad de controlar las malas hierbas mediante otros métodos. Por ejemplo, el deshierbe se lleva a cabo aún en cultivos donde los herbicidas selectivos no han sido desarrollados o donde el espacio a “limpiar” es pequeño que impide la entrada de maquinaria.

Fuego

Es una herramienta que ha estado disponible por siglos para la manipulación de la vegetación. En países en vías de desarrollo es aún utilizado para remover la vegetación y los restos de cultivo así como preparar tierras forestales para su regeneración después de la tala rasa. El incendio de los campos de cultivo para remover los residuos del cultivo anterior puede eliminar patógenos, insectos o inclusive malas hierbas que pueden aparecer en el nuevo cultivo. El fuego se utiliza algunas veces para remover malas hierbas y otros residuos en las orillas de carreteras, de los canales, zanjas y tierras libres.

Labranza

El mayor beneficio de la labranza es la prevención y la supresión de las malas hierbas. La labranza suprime a las malas hierbas ya sea rompiendo,

cortando o desgarrándolas del suelo, esto las expone a la desecación y por lo tanto a la sofocación y muerte. La labranza repetida puede además, reducir la densidad de las malas hierbas de los campos mediante la disminución de semillas o propágulos vegetativos en el suelo. La labranza repetida también puede agotar las reservas de carbohidratos de las malas hierbas perennes, y por lo tanto, suprimirlas.

La labranza no sólo es importante para el control de las malas hierbas sino que también por otras razones:

- preparación del suelo
- entierra los residuos de cultivo
- controla patógenos de las malas hierbas, insectos y roedores
- mejora temporalmente las condiciones físicas del suelo
- entre otros

Las semillas de las malas hierbas que se encuentran cercanas a la superficie del suelo no son dañadas por la labranza, pero un control efectivo sobre las plántulas se puede lograr si la labranza es programada adecuadamente. La mortalidad de malas hierbas es más probable con la labranza cuando las plantas son pequeñas. Los mejores resultados de la labranza se obtienen cuando el suelo está seco y existe calor. Estas condiciones permiten la oportunidad óptima de las malas hierbas a sufrir desecación y morir después de la remoción del suelo. Por ejemplo, cerca del 60% de reducción de plantas de zacate Johnson (*Sorghum halepense*) ocurrió cuando la labranza se llevó a cabo adecuadamente comparado con tratamiento sin labranza (Radosevich *et al.*, 1975).

Siega y trituración

Es un método utilizado para el control de malas hierbas. Usualmente la siega se realiza para facilitar otras actividades de manejo y reducir el crecimiento de las malas hierbas, tales como la supresión temporal de las malas hierbas en huertos y viñedos para facilitar las operaciones de cosecha. La siega de las malas hierbas puede reducir el uso de agua en huertos y viñedos, ya que las plantas sin follaje no pueden usar la humedad del suelo rápidamente. En algunas situaciones, es deseable disminuir la densidad de vegetación que existe sin matarla. La siega de la vegetación herbácea debe de llevarse a cabo antes de que las plantas produzcan semillas con el fin de frenar la diseminación de las semillas producidas. Ya que las plantas segadas, aún las anuales usualmente generan nuevos brotes, la siega frecuente es necesaria para prevenir la producción de semillas.

Uso de cadenas y dragado

Se trata de una cadena pesada, similar a la utilizada para anclar los buques, que se arrastra entre dos tractores. En algunos casos, una hoja de metal está soldada a través de cada eslabón de la cadena. A medida que la cadena “rueda” entre los dos tractores, los tallos de los arbustos son aplastados y algunas plantas son arrancadas. Este procedimiento se utiliza para preparar los matorrales o chaparral para el mejoramiento de pastizales. Las dragas se utilizan principalmente para eliminar las malas hierbas acuáticas sumergidas y emergidas de los canales y ríos.

Inundación

La inundación se utiliza en algunas regiones para controlar malas hierbas perennes establecidas. Se ha utilizado satisfactoriamente para controlar *Sorghum halepense*, *Centaurea repens*, *Cardaria draba* y *Solanum elaeagnifolium*. La inmersión completa durante uno o dos meses en el

verano con una lámina de agua de 15 a 25 cm es necesaria para matar estas especies, ya que no pueden extender su follaje sobre la superficie del agua.

Coberturas y solarización

El objetivo principal de las coberturas es evitar la entrada de la luz solar a las plántulas de las malas hierbas. Esto provoca la inhibición de la fotosíntesis causando que las plántulas mueran. Las coberturas comúnmente usadas son de paja, estiércol, césped cortado, aserrín, cáscara de arroz u otros residuos de cultivo, papel y plástico. Actualmente, se pueden utilizar coberturas artificiales hechas de tejido de plástico. Las coberturas excluyen longitudes de onda de luz particulares, usualmente en la región activa fotosintética del espectro de luz, pero permite la penetración en el suelo del agua, nutrientes y aire. Las coberturas controlan efectivamente pequeñas malas hierbas anuales, plantas más grandes y algunas perennes pueden ser controladas utilizando coberturas.

La solarización del suelo consiste en cubrir el suelo húmedo labrado con un plástico transparente para matar las semillas de malezas embebidas. Las láminas de plástico se dejan cubriendo la superficie del suelo durante aproximadamente cuatro semanas. Los períodos largos de radiación solar total, los cuales causan temperaturas elevadas del suelo, son necesarios para obtener los mejores resultados. No está claro si las altas temperaturas u otros factores aumentan la mortalidad de semillas de las malas hierbas. Algunos experimentos sugieren que la microflora y microfauna del suelo son también dañados o muertos por la solarización.

1.4.2. Métodos culturales para el control de malas hierbas

Prevención de las malas hierbas

La prevención de un problema de malas hierbas es generalmente más fácil y menos costoso que los intentos de control o erradicación que siguen a después de su introducción, debido a que las malas hierbas son más tenaces y difícil de controlar después de que se han establecido. Algunas medidas recomendadas para evitar la introducción de malas hierbas en lugares donde no existen son los siguientes:

- La utilización de semillas limpias (de malas hierbas) del cultivo a establecer.

- En el uso de estiércol, se debe de estar seguro que está completamente fermentada y no contiene semillas de malas hierbas aún viables.

- Limpieza total de la maquinaria agrícola.

- Evitar el transporte de suelo infestado de malas hierbas a áreas limpias.

- Eliminar las malas hierbas que están cerca de las zanjas de riego, cercas y otras tierras no cultivadas.

- Utilizar mallas para filtrar el agua de riego.

Otras prácticas utilizadas para prevenir y evitar problemas potenciales de malas hierbas a nivel regional, estatal o nacional son las leyes que existen referentes a las malas hierbas y semillas así como también las cuarentenas.

Rotación de cultivos

Se refiere al establecimiento de diferentes cultivos en la misma área de cultivo año tras año. Es un método importante de control de malas hierbas en cultivos anuales y cultivos perennes de corta duración. Ciertos tipos de malas hierbas normalmente se asocian a ciertos cultivos, por ejemplo: *Echinochloa* spp. en el cultivo de arroz ó *Cuscuta* spp. en alfalfa.

Asociaciones de malas hierbas con cultivos pueden ser disuadidas creciendo en secuencia cultivos que difieren en crecimiento y necesidades culturales. Esta práctica dificulta el desarrollo de las poblaciones de malas hierbas que están bien adaptadas a las condiciones de crecimiento de cualquier cultivo en particular. La rotación de cultivos permite además el uso de distintos herbicidas u otras herramientas.

Reducción de la competencia

El rendimiento de un cultivo depende de la cantidad, tamaño y proximidad de malas hierbas presentes después de la emergencia del cultivo. El vigor de las malas hierbas esta también influenciado por la abundancia del cultivo, tamaño y proximidad. Por lo tanto, las practicas culturales que cambian el equilibrio de la competencia hacia el cultivo usualmente desfavorecerán la ocurrencia de malas hierbas y mejorarán el rendimiento del cultivo.

Algunos de los factores que mejoran la competitividad del cultivo son:

- Selección de las variedades de cultivo bien adaptadas.
- Fecha de siembra óptima.
- Siembra adecuada (distancia entre líneas).
- Enmiendas del suelo
- Manejo adecuado del agua

Cualquier uso de prácticas que ayuden al establecimiento uniforme del cultivo usualmente ayudará a la reducción en la prevalencia de malas hierbas.

1.4.3. Control biológico de malas hierbas

En el ambiente agrícola se encuentran muchos otros organismos, incluyendo malas hierbas, patógenos, insectos y animales. Algunos de estos organismos utilizan plantas específicas como fuente de alimento. En muchos casos, una gran variedad de plantas fueron introducidas en nuevas regiones sin estos “enemigos naturales”. La falta de estos organismos después de la introducción de una mala hierba permite a estas poblaciones incrementarse rápidamente a niveles que eventualmente pueden crear problemas a los intereses humanos.

El control biológico de malas hierbas es el uso de organismos vivos para bajar el nivel de la población o la habilidad competitiva de las malas hierbas por lo que dejan de ser un problema económico. A través del tiempo, se han logrado varios éxitos en el control biológico de malas hierbas.

Pastoreo

El pastoreo es quizás la forma más antigua y común del control biológico de malas hierbas. Se puede lograr utilizando una amplia variedad de animales que consumen la vegetación, incluyendo rumiantes y ungulados, aves, insectos y pescados.

Micoherbicidas

Patógenos de plantas han sido utilizados para controlar efectivamente malas hierbas en programas de control biológico, debido a que los patógenos son fácilmente cultivados en medios artificiales, mientras que los insectos y otros agentes de control biológico no lo son. Aún más, los patógenos pueden ser aplicados en campos usando las mismas técnicas y maquinaria que los herbicidas. Un organismo utilizado de esta manera se

ha llamado bio-herbicida, o si el organismo es un hongo un micoherbicida. Los organismos que se utilizaran como micoherbicidas deben de producir grandes cantidades de inóculo que sean fácilmente colectables además de ser:

Fácilmente cultivado en laboratorio

Altamente virulento con la mala hierba

Selectivo a plantas deseables

Seguro para humanos y animales

Alelopatía

La alelopatía es el efecto mutuo entre dos especies y comprende la producción de sustancias químico-toxicas del follaje, raíces y otras partes subterráneas e igualmente la acción de los residuos de estos órganos, que son liberados al ambiente y que pueden ser nocivos o estimulantes para la germinación o reducir el crecimiento de otras plantas vecinas (García y Fernández, 1991). La alelopatía se ha convertido en un método interesante en el uso de plantas o residuos de plantas para controlar malas hierbas. Un ejemplo claro del control de malas hierbas por alelopatía es el uso de cultivos de cobertura con leguminosas tales como *Mucuna pruriens*, *Canavalia ensiformis*, y *Neonotonia wightii* que además de aportar nitrógeno, materia orgánica y otros importantes beneficios (Domínguez y Medina, 2000) ejercen un control satisfactorio de las malas hierbas (Domínguez, 2004; Hernández, 2005).

1.4.4. Control químico de malas hierbas

Las sustancias químicas han sido utilizadas por mucho tiempo para controlar malas hierbas, sustancias como nitrato de sodio, sulfato de amonio o ácido sulfúrico presentaban un control efectivo de las malas

hierbas en cultivos de cereales alrededor de 1900. Los primeros usos no selectivos de otros productos químicos, a menudo los subproductos industriales o sales, se habían utilizado antes de 1900 para matar malas hierbas en áreas no agrícolas. El uso de sustancias químicas se incrementó y expandió exponencialmente con el descubrimiento de varias sustancias orgánicas sintéticas que mataban o suprimían la vegetación. Con el descubrimiento casi simultáneo del MCPA y 2,4-D en la década de 1940 en el Reino Unido y Estados Unidos se marcó el comienzo de la era moderna en el control químico de las malas hierbas.

Herbicidas

Los herbicidas son sustancias químicas sintéticas usadas para matar o suprimir vegetación no deseada. Dentro de las razones para el éxito abrumador de los herbicidas como herramientas para el control de malezas se encuentran (Ross y Lembi, 1985):

- Los herbicidas permiten el control de malas hierbas donde el manejo es difícil, por ejemplo dentro y entre las hileras de los cultivos donde existe un espacio estrecho.
- Los herbicidas reducen las operaciones de labranza requeridas para el establecimiento del cultivo.
- El control de las malas hierbas con químicos frecuentemente permite una plantación anticipada, debido a que algunas operaciones de labranza pueden ser eliminadas.
- Los herbicidas han reducido la cantidad de esfuerzo humano gastado por el deshierbe manual y mecánico.
- Las malas hierbas no pueden ser controladas económicamente por la labranza u otros medios, frecuentemente pueden ser controladas efectiva y eficientemente mediante el uso de herbicidas.

Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas se pueden clasificar de diferentes formas, sin embargo una de las más aceptadas es por el sitio de acción. La HRAC (Comité de Acción Contra la Resistencia a Herbicidas) clasifica a los herbicidas en 22 grupos:

Tabla 1- 1. Clasificación de los herbicidas según el sitio de acción (HRAC, 2012).

Grupo	Sitio de acción	Grupo químico
A	Inhibición de la enzima acetil CoA carboxilasa (ACCase)	Ariloxyfenoxipropionatos ('FOPs') Ciclohexanodionas ('DIMs') Fenilpirazolines ('DEN')
B	Inhibición de la acetolactato sintetasa (ALS)	Sulfonilureas 'SU' Imidazolinonas 'IMI' Triazolopirimidinas Sulfonil-aminocarbonil-triazonilinas
C₁	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas Triazinonas Uracilos Piridazinona
C₂	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Ureas Amidas
C₃	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Nitrilos Benzotiadiazol Fenil-piridazina
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I	Bipiridilos
E	Inhibición del protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres N-fenil-ftalamidas Tiadiazoles
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Piridazinona Nicotinanilida

Continúa

Grupo	Sitio de acción	Grupo químico
F2	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Trikenona Ixosazol Pirazol
F3	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides	Triazol Isoxazolidinona Urea
G	Inhibición de la EPSP sintasa	Glicinas
H	Inhibición de la glutamino sintetasa (Ácido fosfínico)	Ácido fosfínico
I	Inhibición del DHP (dihidropterato) sintetasa	Carbamato
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos de la mitosis	Dinitroanilinas Fosforoamidatos
K2	Inhibición de la mitosis	Carbamatos Benzileter
K3	Inhibición de la división celular	Cloroacetamidas Carbamato Acetamida Benzamida
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Nitrilos Benzamida
M	Desacopladores (alteración de la membrana)	Dinitrofenoles
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCasa)	Tiocarbamatos Fosforoditioato Benzofurano
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético, AIA)	Ácidos fenoxi-carboxílicos Ácido benzoico Ácido piridin-carboxílico Ácido quinolin-carboxílico
P	Inhibición del AIA	Ftalamato Diflufenzopir
Z	Desconocido	Ácido arilamino propiónico, organoarsenicales otros

El sitio de acción de un herbicida se refiere al sitio bioquímico que el herbicida inhibe directamente (Kogan y Pérez, 2003).

Problemas con el uso de herbicidas

Se debe hacer notar que los herbicidas son solamente un tipo de herramienta disponible para el control de las malas hierbas. Debido a la efectividad de los herbicidas existe a veces una tendencia entre los agricultores y técnicos esperar que cualquier problema con alguna mala hierba esta pueda ser controlada efectivamente por medios químicos.

Tal actitud puede conducir a una supresión de malas hierbas más cara o menos efectiva, porque otros métodos de eficacia comprobada, como la prevención, limpieza, la labranza, la competencia y rotación de cultivos son opciones viables.

Sin embargo, otros problemas más importantes asociados al uso de herbicidas son los daños provocados a otros cultivos/vegetación, residuos en el suelo y agua, toxicidad a otros organismos, preocupaciones para la salud y seguridad humana (Radosevich *et al.*, 1997), además de la resistencia de las malas hierbas a dichas moléculas.

1.5. Referencias

- Barkley, T.M. (1983). Field Guide to the Common Weeds of Kansas: 142-143. *Kansas Agricultural Experimental Station contribution number 82-547-B*. University Press of Kansas. 164 p.
- Bhowmik, P.C. & Bekech, M.M. (1993). Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence and distribution in no-tillage and conventional-tillage corn (*Zea mays*). *Agronomy Journal* 1: 67-71.
- Cobb, A. (1992). Herbicides and plant physiology. London, England, UK: Chapman & Hall.
- Domínguez, M.S. (2004). Actividad alelopática de *Mucuna pruriens* (L.) DC. var. *utilis* y *Neonotonia wightii* (Wigh. & Arn.) Lackey sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Sorghum halepense* (L.) Pers. y *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W. D. Clayton. *Tesis Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola*. Universidad Autónoma Chapingo. 44 p.
- Domínguez, V.J.A. & Medina, P.J.L. (2000). Cultivos de cobertura: Componentes indispensables para una agricultura sustentable. *Revista Mexicana de la Ciencia de la Maleza*, UACH, Chapingo, México. México. 1: 36-45.
- García, J.W., Macbryde, B., Molina, A. & Herrera, O. (1975). Malezas prevalentes de América Central. *International Plant Protection Center, Oregon State University*, Corvallis, Oregon. 161 p.
- García, T. & Fernández, C. (1991). Fundamento sobre malas hierbas y herbicidas. *Ministerio de agricultura, Pesca y Extensión Agraria*. Primera Edición. Madrid: Mundi Prensa p. 348.
- Green, D.E., Woolley, D.G. & Mullen, R.E. (1981). Agronomy. Principles and Practice. *Burgess Publishing Company*. 303 p.

- Hernández, G.E. (2005). Actividad alelopática de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de *Sorghum halepense* (L.) Pers. y *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W. D. Clayton. *Tesis Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia*. Universidad Autónoma Chapingo. 42 p.
- Holm, L.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V. & Herberger, J.P. (1977). *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. The University Press of Hawaii, Honolulu. 609 p.
- Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) (2012). <http://www.hracglobal.com/Home.aspx>. Visitado: Junio de 2012.
- Hulme, P.E. (2012). Weed risk assessment: a way forward or a waste of time?. *Journal of Applied Ecology* 49: 10-19.
- Kogan, M.A. & Pérez, A.J. (2003). *Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T. & Tsomondo, T. (2001). Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture Ecosystem and Environment* 84: 1–20.
- Radosevich, S.R., Smith, N.L. & Kegel, F. (1975). Johnsongrass control in field corn. *Western Society of Weed Science*. Prog. Rep. 62-64.
- Radosevich, S.R., Holt, J. & Ghersa, C. (1997). *Weed Ecology. Implications for Management*. John Wiley & Sons, Inc.
- Ross, M.A. & Lembi, C.A. (1985). *Applied Weed Science*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN.
- Swanton, C.J., Harker, K.N. & Anderson, R.L. (1993). Crop losses due to weeds in Canada. *Weed Technology* 7: 537–542.
- Williams, F., Eschen, R., Harris, A., Djeddour, D., Pratt, C., Shaw, R.S., Varia, S., Lamontagne-Godwin, J., Thomas, S.E. & Murphy, S.T.

(2010). The economic cost of invasive non-native species on Great Britain. CABI Publishing, Wallingford.

CAPÍTULO II

**SUSCEPTIBILIDAD DIFERENCIAL AL
HERBICIDA GLIFOSATO ENTRE
ESPECIES DE *Conyza* PRESENTES EN
ESPAÑA**

Resumen

Ensayos de laboratorio e invernadero se llevaron a cabo para investigar las diferencias en susceptibilidad entre tres especies del género *Conyza* introducidas como malas hierbas en España: *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* y *Conyza sumatrensis*. El material vegetal se obtuvo de semillas recolectadas en los cultivos de olivar y cítricos en el sur de España, sin registro ninguno de aplicaciones previas del herbicida glifosato. Las curvas dosis-respuesta mostraron diferentes valores de ED₅₀: 2.9, 15.7 y 34.9 g ia (ingrediente activo) ha⁻¹, respectivamente para *C. sumatrensis*, *C. bonariensis* y *C. canadensis* en el estadio de roseta (6-8 hojas). Diferencias significativas se encontraron entre las tres especies en la retención foliar de herbicida, así como también en el ángulo de contacto. El orden de acuerdo a la retención foliar del herbicida fue *C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*, mientras que los valores medios del ángulo de contacto fueron 59.2, 65.5 y 72.9°, respectivamente. No existieron diferencias significativas entre las tres especies de acuerdo a la absorción foliar de ¹⁴C-glifosato (los valores encontrados fueron desde 37.4% para *C. canadensis* a 52.4% para *C. sumatrensis*) el orden entre las especies fue el mismo que la retención foliar del herbicida. La cantidad de radiactividad translocada de las hojas tratadas fue menor en *C. canadensis* comparada con las otras dos especies (*C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*). Entre todos los resultados de los parámetros estudiados, se ha identificado una susceptibilidad diferencial al herbicida glifosato entre las especies de *Conyza*. Existió una acumulación de ácido shiquímico después de la aplicación de glifosato a la dosis de 200 g ia ha⁻¹. Sin embargo, *C. canadensis* mostró una menor cantidad de ácido shiquímico respecto a las otras dos especies a 168 h después del tratamiento. En *C. bonariensis*, se realizaron estudios en

invernadero para determinar la susceptibilidad al herbicida glifosato en tres estadios diferentes de crecimiento: roseta, elongación del tallo (10-15 cm de altura) y floración. El menor ED₅₀ obtenido fue durante el estadio de roseta (15.7 g ia ha⁻¹), comparado con la elongación del tallo (86.6 g ia ha⁻¹), obteniendo el mayor ED₅₀ durante el estadio de floración (117.5 g ia ha⁻¹); las plantas en un estadio temprano de crecimiento retuvieron una mayor cantidad de glifosato. Los resultados están en concordancia con observaciones en campo donde las plantas más jóvenes son más susceptibles al herbicida glifosato.

Abstract

Greenhouse and laboratory experiments were conducted to investigate differences in glyphosate susceptibility among three species of the genus *Conyza* introduced as weeds in Spain: tall fleabane (*Conyza sumatrensis*), hairy fleabane (*Conyza bonariensis*), and horseweed (*Conyza canadensis*). Plant material was obtained from seeds collected in weed populations growing in olive groves and citrus orchards in southern Spain, with no previous history of glyphosate application. Dose-response curves displayed ED₅₀ values of 2.9, 15.7, and 34.9 g ai ha⁻¹, respectively, for *C. sumatrensis*, *C. bonariensis*, and *C. canadensis* plants at the rosette stage (6-8 leaves). Significant differences were found among the three species in the glyphosate retention on leaves as well as the leaf contact angle. The species order according to glyphosate retention was *C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*, while the mean contact angles of glyphosate droplets were 59.2, 65.5, and 72.9°, respectively. There were no significant differences among species in the absorption of ¹⁴C-glyphosate (ranged from 37.4% for *C. canadensis* to 52.4% for *C. sumatrensis*), but the order among species was the same as glyphosate retention. The amount of radioactivity translocated from treated leaves was lower in *C. canadensis* as compared to the other two species (*C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*). Combined, all of the studied parameters identified differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* species. Each species accumulated shikimate in leaf tissues following application of glyphosate at 200 g ai ha⁻¹. However, *C. canadensis* exhibited lower shikimate levels than the other two species at 168 h after herbicide application. For hairy fleabane, a greenhouse study explored its susceptibility to glyphosate at three developmental stages: rosette, bolting (stem height, 10-15 cm), and flowering. The ED₅₀ was lower at the rosette stage (15.7 g ai ha⁻¹) as compared to bolting (86.6 g ai

ha⁻¹), with the highest ED₅₀ values occurring at flowering (117.5 g ai ha⁻¹); plants at the earlier developmental stage retained more glyphosate. These results agree with field observations that plants at early developmental stages are more sensitive to glyphosate.

2. INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies del género *Conyza* Less. (Asteraceae) se encuentran en Europa como neófitos introducidas desde América del Norte y del Sur. Estas especies invasoras, se consideran actualmente como una de las especies vegetales más comunes en el territorio receptor (Thebaud y Abbott, 1995), se comportan principalmente como plantas ruderales, que habitan en los márgenes de la carretera, campos abandonados, márgenes de ríos, terrenos baldíos, urbanos, etc. *Conyza* spp. aparecen como malas hierbas en más de 40 cultivos en 70 países (Holm *et al.*, 1997). Recientemente, *Conyza* spp. está aumentando su severidad en huertos de frutales y olivares en el sur de España (Urbano *et al.*, 2007). Antes de las prácticas de labranza de conservación (principalmente cítricos y olivos), *Conyza* spp. era controlada fácilmente con la labranza (Brown y Whitwell, 1988). Incluso con la supresión de la labranza primaria, la aplicación de glifosato en la primavera era un instrumento eficaz para el control de *Conyza*. Sin embargo, en una reciente encuesta de los distribuidores en el sur de España, *Conyza* spp. junto con *Lolium* spp., son consideradas las malas hierbas más importantes en los huertos de frutales a pesar del uso extensivo de herbicidas (Calha *et al.*, 2008). Varios factores podrían explicar esto: aplicación de glifosato en las etapas posteriores del desarrollo de las malas hierbas en las cuales son más tolerantes; susceptibilidad diferencial entre las especies de *Conyza* y la selección de biotipos que presentan resistencia a los herbicidas (González-Torralva *et al.*, 2009; Heap, 2012).

En España, existen tres especies anuales de *Conyza* que se encuentran dispersas en los huertos de cítricos y olivos: *C. bonariensis* ((L.) Cronq.), *C. canadensis* ((L.) Cronq.) y *C. sumatrensis* ((Retz.) E. Walker). En las tres especies, la emergencia de plántulas se lleva a cabo preferiblemente

en invierno (Recasens y Conesa, 2009), una sola planta de *Conyza* spp. es muy prolífica; *C. canadensis* puede producir 50 000-200 000 semillas por planta (Holm *et al.*, 1997). Las semillas son dispersadas por el viento, se han medido distancias de hasta 500 m *C. canadensis* (Dauer *et al.*, 2007). La capacidad de dispersión de las semillas sugiere que las estrategias de control se deben llevar a cabo a grandes escalas y no solamente en pequeñas superficies (Dauer *et al.*, 2007). Además, en algunos cultivos se ha documentado la longevidad de semillas en el suelo hasta 3 años (Wu *et al.*, 2007). Todos los rasgos biológicos anteriores contribuyen a la dificultad a largo plazo en la gestión de las especies de *Conyza* (Wu *et al.*, 2007). Por estas razones, en los huertos donde se practica la labranza de conservación es necesario el control antes de la siembra. Como alternativa, los cultivos de cobertura están siendo utilizados para prevenir o reducir el uso de herbicidas en la agricultura intensiva (Cruz-Hipolito *et al.*, 2009). Sin embargo, la dependencia de herbicidas para controlar las malas hierbas aún persiste, sobre todo debido a su alta eficacia para controlar el amplio espectro de las mismas asociadas con cada cultivo en particular (Hao *et al.*, 2009; Weaver, 2001; Wu *et al.*, 2007).

El herbicida glifosato se ha utilizado ampliamente en la agricultura mundial durante unos 30 años, y hoy es el herbicida más comercializado en el mundo (Duke y Powles, 2008). Dicho herbicida pertenece al grupo químico de los inhibidores de la síntesis de aminoácidos con nombre químico N-(fosfonometil) glicina (Franz *et al.*, 1997). Tras la absorción, es fácilmente traslocado con fotosintatos desde las hojas al tejido meristemático (Ferreira *et al.*, 2008). En las plantas sensibles, el glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvilshiquimato 3 fosfato sintasa (EPSPS) (EC 2.5.1.19) (Steinruecken y Amrhein, 1980). La EPSPS es la enzima crítica y esencial que cataliza la conversión de shiquimato 3-fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato (PEP) para PEPS (Kaundun *et al.*, 2008; Yu *et al.*,

2007). La ruta del ácido shiquímico juega un papel fundamental en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos esenciales: fenilalanina, tirosina y triptófano, así como otros compuestos secundarios importantes como las auxinas y aleloquímicos (Harring *et al.*, 1998). En el sur de España, el glifosato ha sido recomendado para el control de *Conyza* spp. en los cultivos de cítricos y olivar durante muchos años.

2.1. Objetivos

Los objetivos de esta investigación fueron: 1) determinar en condiciones de invernadero, la eficacia del glifosato en *C. sumatrensis*, *C. bonariensis* y *C. canadensis*, 2) caracterizar física (retención foliar y ángulo de contacto) y fisiológicamente (acumulación de ácido shiquímico, absorción y translocación de ^{14}C -glifosato) los factores que podrían explicar la sensibilidad diferencial a glifosato en estas especies, 3) evaluar la eficacia de glifosato bajo condiciones de campo en *C. bonariensis* y *C. canadensis* durante tres estadios de crecimiento.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Herbicidas

^{14}C -glifosato (actividad específica, 273.8 MBq mmol⁻¹; 95% de pureza) fue proporcionado por Sigma Aldrich (Francia). Una formulación comercial de este herbicida (Roundup Energy 45% w/v SL) fue suministrado por Monsanto Agricultura España, SL y se utilizó para todos los ensayos *in vivo* e *in vitro*.

2.2.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron poblaciones sensibles a glifosato de *C. sumatrensis*, *C. bonariensis* y *C. canadensis*. Las semillas fueron recolectadas en 2006 en el sur de España. *C. bonariensis* y *C. canadensis* se recolectaron en fincas de olivo en Córdoba, mientras que *C. sumatrensis* se recolectó en fincas de cítricos en Huelva. En ninguno de los casos se había aplicado glifosato para el control de estas malas hierbas. Las semillas se sembraron en macetas de 663 cm³ con turba y se cubrieron con film transparente hasta su emergencia. Las plántulas fueron transplantadas a macetas (una planta por maceta) conteniendo una mezcla de turba-arena (1:1 v/v) y fueron colocadas en cámara de crecimiento a 28/18 °C (día/noche), con un fotoperíodo de 16 h, 850 μmol m⁻²s⁻¹ de densidad luminosa y 80% de humedad relativa.

2.2.3. Ensayos de dosis-respuesta

El herbicida glifosato fue aplicado a las plantas en el estado de roseta, es decir, en el estadio de crecimiento 14-15 según la escala fenológica BBCH (Hess *et al.*, 1997), utilizando una cámara de tratamientos equipada con boquillas de abanico plano (Tee Jet SVE 8002) a una altura

de 50 cm. Se aplicaron las siguientes dosis: 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 g ia (ingrediente activo) ha⁻¹. Por otra parte, para *C. bonariensis*, una especie con el crecimiento vegetativo más rápido en comparación a las otras dos especies, el glifosato fue aplicado en otros dos estadios de crecimiento: elongación del tallo (10-15 cm de altura; BBCH 32) y floración (BBCH 55). El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento (cada repetición con tres plantas). A los 21 días después del tratamiento, las plantas se cortaron a ras de suelo, registrando el peso fresco y expresándolo como porcentaje respecto a un control no tratado. El mismo procedimiento se llevó a cabo en los dos estadios de crecimiento adicionales en *C. bonariensis*. La dosis de herbicida que reduce el crecimiento de la planta en un 50% (ED₅₀) se determinó para cada especie de acuerdo a Menendez *et al.* (2006). Los datos fueron evaluados y ajustados a un modelo de regresión no lineal:

$$Y = c + \{(d - c) / [1 + (x / g)^b]\}$$

Donde *Y* es el peso fresco expresado como porcentaje respecto a las plantas no tratadas, *c* y *d* son coeficientes que pertenecen a las asíntotas inferior y superior, respectivamente, *b* es la pendiente de la curva, *g* es la dosis de herbicida en el punto de inflexión medio entre las asíntotas superior e inferior y representa la ED₅₀ y *x* (variable independiente) es la dosis del herbicida. El análisis de regresión se realizó con el programa SigmaPlot 10.0 (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006).

2.2.4. Ensayos de retención foliar

Se siguió la metodología descrita por Gauvrit (2003). Las plantas de cada especie de *Conyza* en el estadio de roseta (BBCH 14-15) fueron asperjadas en la cámara de tratamientos anteriormente descrita. Además,

el mismo tratamiento se aplicó a las plantas de *C. bonariensis* en los dos estadios superiores de crecimiento: BBCH 32 y BBCH 55. La solución asperjada contenía 200 g de ia ha⁻¹ de glifosato en un volumen de 200 L y 100 mg L⁻¹ Na-fluoresceína. Después de que la solución se había secado en el follaje, las plantas fueron cortadas a ras de suelo y se enjuagaron durante 30 s en 50 mL de NaOH 5 mM. Las lecturas fueron realizadas con un espectrofluorímetro a 490 / 510 nm. Posteriormente, las plantas se colocaron a 80 °C durante 72 h, y la materia seca fue registrada. Se utilizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento (tres plantas por repetición).

2.2.5. Ensayos de ángulo de contacto

La tercera hoja de cada especie de *Conyza* en el estadio de roseta fue cortada y colocada sobre una superficie horizontal. Cada hoja fue tratada con una gota de 1 µL conteniendo glifosato a una dosis de 200 g ia ha⁻¹ en un volumen de 200 L. Las gotas se aplicaron en el centro de la superficie adaxial cada 18 s. El patrón de deposición de las gotas se observó en un microscopio horizontal (LeicaMZ6 1,8 X-4X). Las imágenes fueron captadas con una cámara [LeicaDigilux 4.3 (1:2-8-4.5/8.3-24.9mm) Supermacro Leica Digimacro 4.3] adaptada a uno de los oculares del microscopio. El ángulo de contacto se obtuvo mediante el análisis de las imágenes digitales utilizando el programa ImageJ (Grangeot *et al.*, 2006). Se utilizaron treinta repeticiones para cada especie de *Conyza* spp.

2.2.6. Acumulación de ácido shiquímico

Las plantas de cada especie de *Conyza* en el estadio de roseta fueron tratadas con glifosato (200 g ia ha⁻¹ en un volumen de 200 L ha⁻¹) con la cámara de tratamientos de laboratorio descrita anteriormente. 50 mg de tejido de plantas tratadas y no tratadas fueron cosechadas a 24, 48, 72, 96

y 168 h después del tratamiento y congeladas en nitrógeno líquido, se utilizó la metodología descrita por Perez-Jones *et al.* (2005). La acumulación de ácido shiquímico fue determinada ópticamente mediante un espectrofotómetro a 380 nm, los resultados se expresaron en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco. El experimento consistió en ocho plantas tratadas y tres plantas no tratadas con tres repeticiones.

2.2.7. Ensayos de absorción y translocación de ^{14}C -glifosato

^{14}C -glifosato se mezcló con glifosato formulado comercialmente para preparar una solución con una actividad específica de $0.417 \text{ kBq}^{-1} \mu\text{L}$ (para ensayos de absorción y translocación) y una concentración de glifosato de 1 g de ia L^{-1} (200 g ia ha^{-1} en 200 L). El herbicida radiomarcado se aplicó en dos gotas de $1 \mu\text{L}$ sobre la superficie adaxial de la tercera hoja en cada planta con una micropipeta (Lab Mate HTL). Se aplicó un total de 0.834 kBq por planta. Ensayos preliminares mostraron que a 96 h después de la aplicación de la gota se alcanza la absorción máxima del herbicida. Por lo tanto, las plantas tratadas fueron cuidadosamente removidas de la maceta a 96 h después del tratamiento. La hoja tratada fue cortada cuidadosamente y el ^{14}C -glifosato no absorbido fue lavado con una solución de 3 ml de agua-acetona ($1:1 \text{ v / v}$). Posteriormente, las plantas fueron separadas en hoja tratada, resto de planta y raíz. La solución de enjuague fue mezclada con 7 ml de líquido de centelleo y analizada por espectrometría (LSS) (Contador de centelleo, Beckman LS 6500). Los tejidos de la planta fueron colocados en estufa a 60°C durante 72 h y después fueron quemadas en un Oxidador biológico (Packard Tri Carb 307). El CO_2 desprendido de la combustión fue atrapado en 18 mL de una mezcla de Carbo-Sorb E y Permafluor ($9-9 \text{ v / v}$) (Perkin-Elmer, BV Bioscience Packard). La radiactividad se cuantificó por LSS, y el porcentaje del herbicida absorbido se expresó como (kBq

en tejido combustionado)/(kBq en tejido combustionado + kBq obtenidos en el lavado) x 100. Se utilizaron 5 repeticiones.

2.2.8. *Phosphor imaging*

La translocación del herbicida fue visualizado mediante un phosphor imager (Ciclón, Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV). Las plantas fueron tratadas como se describe en el ensayo de absorción y translocación; fueron suavemente enjuagadas, colocadas en papel filtro (25 x 12.5 cm) y secadas a temperatura ambiente, posteriormente fueron colocadas durante 6 h junto a una película de lectura, para determinar la dispersión del herbicida marcado. Se utilizaron 3 plantas para ver la translocación del herbicida.

2.2.9. *Ensayos de campo*

Los ensayos de campo se realizaron sobre un olivar (finca "Sotillo Bajo") cerca de la provincia de Córdoba. Se realizaron en tres estadios de crecimiento sobre *Conyza* spp.: roseta (BBCH 14-15), elongación del tallo (BBCH 32), y floración (BBCH 55). El olivar se encontraba bajo un manejo super-intensivo, con árboles espaciados a 2 m entre hileras y 1.5 m dentro de la fila. En el momento de la aplicación de los herbicidas, la distribución relativa de *C. canadensis* y *C. bonariensis* era del 75 y 25% respectivamente, mientras que *C. sumatrensis* estaba ausente. El experimento se realizó con un diseño completamente al azar con tres repeticiones. El área tratada para cada tratamiento fue de 2 m de ancho por 5 m de largo. Los tratamientos incluyeron una control sin tratar y glifosato a 5 L ha⁻¹ (2250 g ia ha⁻¹) (Roundup Energy 45% p / v SL) + Orosorb 0.8% (alcohol etoxilato 8.92% w / v SL). El herbicida se aplicó a 2.3 km h⁻¹ con un pulverizador neumático de mochila equipada con cuatro boquillas de abanico plano (Albus API 11002) a 200 kPa y una

altura de 50 cm; el volumen de aplicación fue equivalente a 200 L ha⁻¹. El efecto de los herbicidas en todos los tratamientos se evaluó cuantitativamente a los 90 días después de la aplicación en el estadio de roseta (BBCH 14-15). Un cuadrado de 0.25 m² fue arrojado al azar en cada unidad experimental, y todo el material vegetal fue cortado a ras de suelo y colocado en bolsa de papel (24.8 x 35.3 cm). El material vegetal se secó a 80 °C durante 96 h, y se registró el peso seco de cada muestra. Los resultados se expresaron en g de peso seco por m².

2.2.10. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos al análisis de varianza. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey (HSD) al 5% de probabilidad. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistix v. 8.0.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Ensayos de dosis-respuesta

En condiciones de invernadero, las tres especies de *Conyza* mostraron una alta sensibilidad al herbicida glifosato en el estadio de roseta (BBCH 14-15). Sin embargo, existieron diferencias aparentes entre especies. *C. sumatrensis* que tuvo un ED₅₀ de 2.9, seguido de *C. bonariensis* con un ED₅₀ de 15.7 y *C. canadensis* con el ED₅₀ de 34.9 g ia ha⁻¹. Estos resultados muestran que *C. bonariensis* y *C. canadensis* son 5.4 y 12 veces más tolerante, respectivamente, al herbicida glifosato que *C. sumatrensis* (Tabla 2-1).

Tabla 2- 1. Parámetros del modelo^a usado para calcular la dosis requerida de glifosato para causar el 50% (ED₅₀) de daño en plantas de *Conyza* spp. en el estadio de roseta (BBCH 14-15).

	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>b</i>	ED ₅₀ (g ia ha ⁻¹)	Pseudo r ² ^b	<i>P</i> ^c
<i>C. sumatrensis</i>	0.93	99.99	0.74	2.9 ± 3.1	0.98	<0.0001
<i>C. bonariensis</i>	0.84	99.99	2.09	15.7 ± 0.8	0.99	<0.0001
<i>C. canadensis</i>	1.14	100.20	5.20	34.9 ± 1.6	0.97	<0.0001

^a $Y = c + \{(d - c) / [1 + (x / g)^b]\}$ donde *Y* es el peso fresco (% del control no tratado), *x* (variable independiente) es la dosis del herbicida, *c* y *d* son las asíntotas inferior y superior, *b* es la pendiente de la línea, y *g* (ED₅₀) es la dosis efectiva requerida que causa el 50% de daño en la planta. Los datos fueron analizados y ajustados al modelo de regresión no lineal. ^b Coeficiente de determinación aproximado del modelo no lineal con una intersección calculada como $r^2 = 1 - (\text{suma de los cuadrados de la regresión} / \text{suma total corregida de los cuadrados})$. ^c Nivel de probabilidad del modelo no lineal. ED₅₀ ± error estándar de las medias.

Las infestaciones de *Conyza* spp. se han generalizado en el sur España. Estas especies son problemáticas en los sistemas productivos de no

laboreo, que dependen en gran medida del herbicida glifosato para el control de las malas hierbas. En condiciones de campo, *Conyza* spp. es tratada comúnmente en diferentes estadios de crecimiento. La susceptibilidad al herbicida depende del estadio de crecimiento y esto podría ser un factor limitante para la eficacia de los tratamientos. De hecho, nuestros resultados indican que, para *C. bonariensis* el valor de la ED₅₀ aumentó en 7.5 veces en el estadio de floración a las plantas tratadas en el estadio de roseta (Tabla 2-2). La determinación de si la respuesta reducida al herbicida glifosato se debió a la cobertura del herbicida o cambios fisiológicos en el crecimiento de las plantas no fueron determinados. Las investigaciones realizadas por Koger *et al.* (2004) y Shrestha *et al.* (2007) confirman que *C. canadensis* presentó mayor sensibilidad al herbicida glifosato en el estadio de roseta comparado con estadios de crecimiento más desarrollados.

2.3.2. Ensayos de retención foliar y ángulo de contacto

Al comparar las tres especies, la relación entre la retención foliar de solución herbicida y el ángulo de contacto de la hoja fue inversa. Las hojas de *Conyza* spp. retuvieron una gran cantidad de solución herbicida, en el rango de 500-800 μL por g^{-1} de peso seco. Sin embargo, la retención foliar de la solución herbicida (1 g a L^{-1}) fue significativamente mayor para *C. sumatrensis* en comparación con las otras especies (Tabla 2-3). En contraste, el ángulo de contacto de las gotas con glifosato comercial fueron significativamente menores en *C. sumatrensis* que en las otras dos especies, en el rango de 65-75° (Tabla 2-3). Investigaciones realizadas por Grangeot *et al.* (2006) sobre *Ambrosia artemisiifolia* han demostrado que la retención foliar se acercó a los 800 μL g^{-1} de materia seca, mientras que el ángulo de contacto fue intermedio, en el rango 70-75°. En comparación, especies difíciles de mojar como trigo de invierno

(*Triticum aestivum* L.) y arveja (*Pisum sativum* L.) la retención foliar fue menos de $50 \mu\text{L g}^{-1}$ (De Ruiter *et al.*, 1990).

Tabla 2- 2. Parámetros del modelo^a usado para calcular la dosis requerida de glifosato para causar el 50% (ED₅₀) de daño en plantas de *Conyza bonariensis* en tres diferentes estadios de crecimiento.

Estadio de crecimiento	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>b</i>	ED ₅₀ (g ia ha ⁻¹)	Pseudo r ^{2 b}	<i>P</i> ^c
Roseta (BBCH 14-15)	0.84	99.99	2.09	15.7 ± 0.8	0.99	<0.0001
Elongación del tallo (BBCH 32)	4.39	95.15	1.96	86.6 ± 24.8	0.98	<0.0001
Floración (BBCH 55)	9.67	95.25	2.41	117.5 ± 31.5	0.84	<0.0001

^a $Y = c + \{(d - c) / [1 + (x / g)^b]\}$ donde *Y* es el peso fresco (% del control no tratado), *x* (variable independiente) es la dosis del herbicida, *c* y *d* son las asíntotas inferior y superior, *b* es la pendiente de la línea, y *g* (ED₅₀) es la dosis efectiva requerida que causa el 50% de daño en la planta. Los datos fueron analizados y ajustados al modelo de regresión no lineal. ^b Coeficiente de determinación aproximado del modelo no lineal con una intersección calculada como $r^2 = 1 - (\text{suma de los cuadrados de la regresión} / \text{suma total corregida de los cuadrados})$. ^c Nivel de probabilidad del modelo no lineal. ED₅₀ ± error estándar de las medias.

La retención foliar depende de la etapa de crecimiento de las plantas, en los ensayos realizados sobre *C. bonariensis* se encontró que la retención foliar fue significativamente más alta ($P = 0.05$) durante la elongación del tallo (BBCH 32): $227 \pm 20 \mu\text{L g}^{-1}$ comparado con el estadio de floración (BBCH 55) con $184 \pm 15 \mu\text{L g}^{-1}$.

La retención foliar y el ángulo de contacto son parámetros importantes en la eficacia del herbicida, ya que determinan la cantidad máxima del mismo que puede penetrar en la planta. En algunos casos, las diferencias entre retención foliar y el ángulo de contacto juegan un papel importante en la eficacia y selectividad del herbicida (Chachalis *et al.*, 2001; Michitte *et al.*, 2007; Norsworthy *et al.*, 2001).

Tabla 2- 3. Retención foliar y ángulo de contacto en las tres especies de *Conyza* spp., tratadas en el estadio de roseta (BBCH 14-15).

	μL solución asperjada g^{-1} de peso seco ^a	Ángulo de contacto (grados) ^a
<i>C. sumatrensis</i>	779 ± 110 a	59.2 ± 1.1 c
<i>C. bonariensis</i>	599 ± 50 b	65.4 ± 0.9 b
<i>C. canadensis</i>	484 ± 80 c	72.9 ± 2.0 a

^a Medias dentro de una columna seguida de la misma letra no son significativamente diferentes al 5% de probabilidad determinado por la prueba de Tukey. Valores medios \pm error estándar de las medias.

2.3.3. Acumulación de ácido shiquímico

Los cambios en los niveles de ácido shiquímico en las plantas son específicamente el resultado de la inhibición de la EPSPS (Amrhein *et al.*, 1980). Dicha inhibición ha sido usada como un marcador para determinar la sensibilidad al herbicida (Mueller *et al.*, 2008). Comparativamente, una especie con una baja acumulación de ácido

shiquímico probablemente requiere más cantidad de glifosato para ser letal (ED₅₀ más alto). Las concentraciones de ácido shiquímico en ausencia de glifosato fueron bajas y tendieron a ser menos de 1500 µg g⁻¹ de peso fresco. Bajo condiciones de laboratorio, después de la aplicación, la concentración final de ácido shiquímico fue de 6000 a 10000 µg g⁻¹ de peso fresco (Fig. 2-1).

Las concentraciones de ácido shiquímico aumentaron en los tejidos foliares en las tres especies de *Conyza*, después de la aplicación de glifosato, con cantidades similares entre *C. sumatrensis* y *C. bonariensis*. Sin embargo, después de 96 h, *C. canadensis* acumuló menos ácido shiquímico que las otras dos especies, lo cual concuerda con el ED₅₀ obtenido para esta especie ya que fue más alto (Tabla 2-1); las diferencias con respecto a las otras dos especies fueron significativas (P = 0.05).

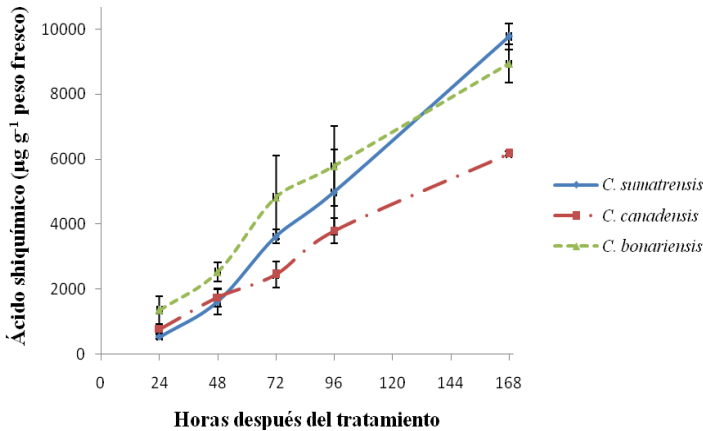


Figura 2- 1. Acumulación de ácido shiquímico en plantas de *Conyza* spp. sensibles después de la aplicación de glifosato a 200 g ia ha⁻¹. Barras verticales representan (±) el error estándar de las medias.

2.3.4. Absorción y translocación de ^{14}C -glifosato

No existieron diferencias significativas en la absorción foliar de ^{14}C -glifosato entre las especies de *Conyza* estudiadas (Tabla 2-4); la penetración del herbicida fue mayor en *C. sumatrensis* que en *C. bonariensis* y *C. canadensis*. Es evidente que estos resultados, junto con los encontrados en los ensayos de retención foliar, podrían explicar la susceptibilidad diferencial entre las tres especies de *Conyza*. Además, hay una clara diferencia entre las especies en la cantidad de herbicida traslocado de la hoja tratada al resto de planta y la raíz. La translocación de glifosato de la hoja tratada a la raíz fue significativamente diferente entre *C. canadensis* (2.8%), *C. bonariensis* (8.3%) y *C. sumatrensis* (11.6%) (Tabla 2-4).

Tabla 2- 4. Absorción y translocación de ^{14}C -glifosato en *Conyza* spp. a 96 h después del tratamiento.

	% Absorción ^a	Translocación (% absorbido) ^b		
		Hoja tratada	Resto de planta	Raíz
<i>C. sumatrensis</i>	52.4 ± 3.8 a	82.4 ± 1.6 b	5.9 ± 1.2 a	11.6 ± 1.5 a
<i>C. bonariensis</i>	48.8 ± 5.5 a	85.2 ± 0.6 b	6.4 ± 0.6 a	8.3 ± 0.1 a
<i>C. canadensis</i>	37.4 ± 9.0 a	93.0 ± 3.5 a	4.0 ± 2.8 b	2.8 ± 0.3 b

^{a, b} Medias dentro de una columna seguida de la misma letra no son significativamente diferentes al 5% de probabilidad determinado por la prueba de Tukey.
Valores medios ± error estándar de las medias.

2.3.5. Phosphor imaging

Las diferencias en translocación de ^{14}C -glifosato entre las especies de *Conyza* fue visualizada mediante phosphor imager (Fig. 2-2). En general, a las 96 horas después de la aplicación del herbicida, la translocación de la hoja tratada fue más rápida, y la acumulación fue mayor en hojas jóvenes comparada con hojas viejas en las tres especies. La translocación a las raíces fue claramente diferente, con menos acumulación de glifosato en *C. canadensis* (Fig. 2-2c) comparada con *C. bonariensis* (Fig. 2-2b) y *C. sumatrensis* (Fig. 2-2a). En este ensayo, la clorosis de las hojas fue evidente a 96 horas después del tratamiento en *C. sumatrensis* y *C. bonariensis*, mientras que en *C. canadensis* solamente el punto de aplicación de la gota permaneció clorótico.

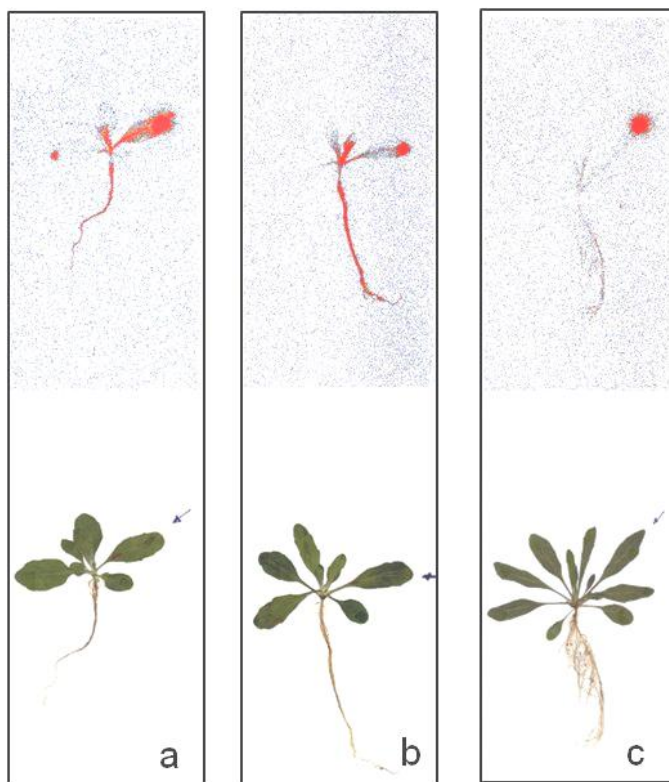


Figura 2- 2. Imágenes representativas demostrando la translocación de ^{14}C -glifosato en plantas de *C. sumatrensis* (a), *C. bonariensis* (b) y *C. canadensis* (c). Las imágenes fueron tomadas a 96 h después del tratamiento; la intensidad del color rojo indica mayor concentración de glifosato. Las flechas (abajo) indican la hoja tratada.

2.3.6. Ensayos de campo

En campo, todas las plantas de *Conyza* fueron sensibles a la dosis comercial de glifosato (Roundup Energy 45% w / v SL). Sin embargo, diferentes niveles de control fueron obtenidos según el estadio de crecimiento (Tabla 2-5). La reducción de la biomasa fue del 96.6% en el estadio de roseta y 86.5% en el segundo estadio (elongación del tallo); sin embargo en el estadio de floración la reducción fue de 45.8% (Tabla 2-5).

La sensibilidad diferencial entre *C. canadensis* y *C. bonariensis* puede explicar por qué la especie dominante en este sitio fue *C. canadensis*.

Tabla 2- 5. Peso seco de la biomasa de *C. bonariensis* y *C. canadensis* en diferentes estadios de crecimiento en la finca de olivar utilizada para los ensayos de campo^a.

Estadio de crecimiento	Peso seco (g m ⁻²) ^b	% de reducción ^c
Roseta	23.8 ± 6.8	96.6
Elongación del tallo	95.7 ± 16.9	86.5
Floración	385.7 ± 67.1	45.8

^a Tratamiento: glifosato 5 L ha⁻¹ (2250 g ia ha⁻¹) + Orosorb 0.8%.

^b El efecto del herbicida fue medido cuantitativamente a 90 días después del tratamiento del estadio de roseta (BBCH 14-15).

^c % de reducción respecto al control no tratado. Control no tratado 711.9 (± 151.4) g peso seco m².

2.4. CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que las tres especies de *Conyza* en el sur España, naturalmente, difieren en la respuesta a glifosato. Aunque los ensayos de campo determinaron que ambas especies pueden ser controladas con las dosis normales comerciales, se encontraron grandes diferencias entre especies. Los ensayos de dosis-respuesta confirmaron que *C. sumatrensis* y *C. bonariensis* son más sensibles a glifosato que *C. canadensis*, con un radio ED_{50} *C. canadensis*/ ED_{50} *C. sumatrensis* en el estadio de roseta (BBCH 14-15) de 10 veces. Esto puede explicarse por la baja retención foliar de esta especie (1.6 veces más baja que *C. sumatrensis*), así como también el reducido ángulo de contacto.

Una vez que el glifosato llega a la superficie foliar, existen diferentes factores fisiológicos que contribuyen a la reducción del transporte del herbicida al sitio de acción. Se determinó que a 96 h después del tratamiento, *C. canadensis* absorbe hasta un 15% menos de glifosato y trasloca hasta un 11% menos comparado con las otras dos especies de *Conyza*. La reducción en la cantidad de glifosato disponible en el sitio de acción en diferentes partes de *C. canadensis* contribuye también a la reducida sensibilidad de esta especie al herbicida glifosato. Esto contribuyó a que existiera menos glifosato en el sitio de acción; *C. canadensis* mostró niveles de ácido shiquímico hasta un 40% más bajos que *C. sumatrensis* a 168 h después del tratamiento.

Dentro de cada especie, la sensibilidad al glifosato se redujo conforme aumentaba el estadio de crecimiento. El manejo adecuado de *Conyza* spp. debe incluir las dosis recomendadas del producto en el estadio óptimo de crecimiento (estadio de roseta). Aunque los productores prefieran incrementar las dosis de los tratamientos conforme aumente el desarrollo

de las plantas, hay que tener en cuenta que esta estrategia puede ocasionar una gran presión de selección y la aparición de resistencia al herbicida. Como el uso de glifosato continúe en los olivares españoles, es de esperar que existan cambios entre las especies. En el ensayo de campo, donde el glifosato fue aplicado, la distribución de *Conyza* spp. ya favorece a *C. canadensis*.

2.5. REFERENCIAS

- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P. & Steinrücken, H.C. (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology* 66: 830-834.
- Brown, S.M. & Whitwell, T. (1988). Influence of tillage on horseweed, *Conyza canadensis*. *Weed Technology* 2: 269-270.
- Calha, I.M., Rocha, F., Ruiz-Santaella, J.P. & Cruz-Hipólito, H.E. (2008). Two decades of herbicide resistance in the Iberian Peninsula. *Journal of Plant Diseases and Protection, Supplement*: 79-84.
- Cruz-Hipolito, H., Osuna, M.D., Heredia, A., Ruiz-Santaella, J.P. & De Prado, R. (2009). Nontarget mechanism involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4844-4848.
- Chachalis, D., Reddy, K.N., Elmore, C.D. & Steele, M.L. (2001). Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among *Ipomoea* species and smallflower morningglory. *Weed Science* 49: 628-634.
- Dauer, J.T., Mortensen, D.A. & Vangessel, M.J. (2007). Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *Journal of Applied Ecology* 44: 105-114.
- De Ruiter, H., Uffing, A.J.M., Meinen, E. & Prins, A. (1990). Influence of surfactants and plant species on leaf retention of spray solutions. *Weed Science* 38: 567-572.
- Duke, S.O. & Powles, S.B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64: 319-325.
- Ferreira, E.A., Galon, L., Aspiazú, I., Silva, A.A., Concenço, G., Silva, A.F., Oliveira, J.A. & Vargas, L. (2008). Glyphosate translocation in hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. *Planta Daninha* 26: 637-643.

- Franz, J.E., Mao, M.K. & Sikorski, J.A. (Eds) (1997). *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. Washington, DC: ACS American Chemical Society.
- Gauvrit, C. (2003). Glyphosate response to calcium, ethoxylated amine surfactant, and ammonium sulfate. *Weed Technology* 17: 799-804.
- González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H.E., Mülleder, N., Domínguez-Valenzuela, J.A. & De Prado, R. (2009). Resistance of *Conyza canadensis* to glyphosate in Spain. *XIIIth International Conference on Weed Biology*. AFPP: Dijon, Francia. 381-386.
- Grangeot, M., Chauvel, B. & Gauvrit, C. (2006). Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. *Weed Research* 46: 152-162.
- Hao, J.H., Qiang, S., Liu, Q.Q. & Cao, F. (2009). Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 245-254.
- Harring, T., Streibig, J.C. & Husted, S. (1998). Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4406-4412.
- Heap, I. (2012). International Survey of Herbicide Resistant Weeds. www.weedscience.org.
- Hess, M., Barralis, G., Bleiholder, H., Buhr, L., Eggers, T., Hack, H. & Stauss, R. (1997). Use of the extended BBCH scale - General for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research* 37: 433-441.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J. & Herberger, J. (Eds) (1997). *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. Wiley.
- Kaundun, S.S., Zelaya, I.A., Dale, R.P., Lycett, A.J., Carter, P., Sharples, K.R. & McIndoe, E. (2008). Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass

- (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science* 56: 637-646.
- Koger, C.H., Poston, D.H., Hayes, R.M. & Montgomery, R.F. (2004). Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technology* 18: 820-825.
- Menendez, J., Bastida, F. & De Prado, R. (2006). Resistance to chlortoluron in a downy brome (*Bromus tectorum*) biotype. *Weed Science* 54: 237-245.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santaella, J.P. & Gauvrit, C. (2007). Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science* 55: 435-440.
- Mueller, T.C., Ellis, A.T., Beeler, J.E., Sharma, S.D. & Singh, M. (2008). Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. *Weed Research* 48: 455-460.
- Norsworthy, J.K., Burgos, N.R. & Oliver, L.R. (2001). Differences in weed tolerance to glyphosate involve different mechanisms. *Weed Technology* 15: 725-731.
- Perez-Jones, A., Park, K.W., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C. & Shaner, D. (2005). Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Science* 53: 775-779.
- Recasens, J. & Conesa, J.A. (2009). *Malas hierbas en plántula: guía de identificación*. Lleida, España: Edicions de la Universitat de Lleida.
- Ruiz-Santaella, J.P., Heredia, A. & De Prado, R. (2006). Basis of selectivity of cyhalofop-butyl in *Oryza sativa* L. *Planta* 223: 191-199.
- Shrestha, A., Hembree, K.J. & Va, N. (2007). Growth stage influences level of resistance in glyphosate-resistant horseweed. *California Agriculture* 61: 67-70.

- Steinruecken, H.C. & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
- Thebaud, C. & Abbott, R.J. (1995). Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: Quantitative trait and isozyme analysis. *American Journal of Botany* 82: 360-368.
- Urbano, J.M., Borrego, A., Torres, V., Leon, J.M., Jimenez, C., Dinelli, G. & Barnes, J. (2007). Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technology* 21: 396-401.
- Weaver, S.E. (2001). The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 867-875.
- Wu, H., Walker, S., Rollin, M.J., Tan, D.K.Y., Robinson, G. & Werth, J. (2007). Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). *Weed Biology and Management* 7: 192-199.
- Yu, Q., Cairns, A. & Powles, S. (2007). Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225: 499-513.

CAPÍTULO III

**MECANISMOS DE RESISTENCIA
INVOLUCRADOS EN *C. canadensis* L. Cronq.
RESISTENTE A GLIFOSATO**

Resumen

Se realizó la investigación de las bases bioquímicas y fisiológicas de la resistencia y sensibilidad en poblaciones de “hierba de caballo” (*Conyza canadensis* L. Cronq.) colectadas en Córdoba, Huelva, Málaga, Jaén y Sevilla en el sur de España. La aplicación de 238 g ae (ácido equivalente) ha^{-1} de glifosato sobre 25 poblaciones en el estadio de roseta (BBCH 14-15) reveló reducciones del peso fresco desde 9 al 99%. El biotipo resistente (R C004) fue 6.1 veces más resistente que el biotipo susceptible (S). La acumulación de ácido shiquímico en ambos biotipos se incrementó hasta las 72 h después del tratamiento (HDT), continuando el aumento (a un 61.2% respecto al valor máximo) en el biotipo S, pero reduciéndose un 40% en el biotipo R (C004). La retención foliar del herbicida así como la absorción de ^{14}C -glifosato entre los biotipos R y S no tienen ningún efecto en la resistencia a este herbicida. Las pruebas cualitativas y cuantitativas mostraron una mayor translocación de ^{14}C -glifosato en el biotipo S que en el R (C004). El herbicida glifosato fue metabolizado más rápido en el biotipo R (C004) que en el S, desapareciendo por conversión en glioxilato, sarcosina y AMPA dentro de las 96 HDT. Por otro lado, 41.43 nmol g^{-1} de peso fresco de todo el glifosato aplicado permaneció en el biotipo S, siendo el glioxilato el único metabolito no tóxico. Estos resultados sugieren que la resistencia al herbicida glifosato en la “hierba de caballo” es debido a dos mecanismos diferentes fuera del sitio de acción: a) translocación diferente del herbicida y b) el metabolismo del herbicida a otros compuestos.

Abstract

The physiological and biochemical basis for glyphosate resistance and susceptibility in horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) populations collected from Córdoba, Huelva, Málaga, Jaén and Seville in southern Spain were investigated. Screening 25 populations treated with glyphosate (238 g ae ha⁻¹) at the rosette stage (BBCH 14–15) revealed reductions in fresh weight (fw) of 9 to 99%. The resistant biotype (R C004) was 6.1 times more resistant than the susceptible biotype (S). Shikimate accumulation in both biotypes increased until 72 h after treatment (HAT) and then continued to increase (to 61.2% respect to the maximum value) in the S biotype but decreased by 40% in the R (C004) biotype. Differential glyphosate spray retention and foliar uptake of applied ¹⁴C-glyphosate between the R (C004) and S biotype had no effect on resistance to this herbicide. Quantitative and qualitative tests showed greater ¹⁴C-glyphosate mobility in the S biotype than in the R (C004) biotype. Glyphosate was metabolized faster in the R (C004) biotype than in the S biotype. The herbicide disappeared completely from the R (C004) biotype by conversion into glyoxylate, sarcosine and AMPA within 96 HAT. On the other hand, 41.43 nmol g⁻¹ fw of all glyphosate applied remained in the S biotype and glyoxylate was its only non-toxic metabolite. These results suggest that glyphosate resistance in horseweed is due to two different non-target mechanisms, namely: (a) impaired glyphosate translocation and (b) glyphosate metabolism to other compounds.

3. INTRODUCCIÓN

El género *Conyza* spp. aparece como malas hierbas en más de 40 cultivos en 70 países (Holm *et al.*, 1997). Este género es uno de los más importantes en los cultivos de olivar y cítricos en el sur de España, donde se incluyen las especies *C. bonariensis*, *C. canadensis* y *C. sumatrensis*. *C. canadensis* es una mala hierba de invierno-primavera originaria de Norteamérica con importancia en sistemas agrícolas de no laboreo (Buhler y Owen, 1997). Esta mala hierba produce una gran cantidad de semillas las cuales son fácilmente dispersadas por el viento, invadiendo con gran rapidez orillas de campos, de carreteras y áreas industriales. Además *C. canadensis* es una mala hierba cosmopolita la cual crece en climas templados, y usualmente se encuentra en áreas no agrícolas con reducida o mínima alteración del suelo (Dauer *et al.*, 2007; Weaver, 2001).

El glifosato [*N*-(fosfonometil)-glicina] es un herbicida no selectivo con poca o nula actividad en el suelo, el cual actúa como un potente inhibidor de la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3 fosfato sintasa (EPSPS; EC 2.5.1.19) bloqueando la síntesis de compuestos en la vía del ácido shiquímico, iniciando una atrofia ultraestructural y deteniendo la síntesis de proteínas (Nandula *et al.*, 2007; Steinruecken y Amrhein, 1980).

Durante sus primeros 20 años de uso, nunca se reportó ningún tipo de resistencia a este herbicida, se consideraba improbable (Bradshaw *et al.*, 1997). Sin embargo, en 1996 *Lolium rigidum* de Australia se reportó como el primer caso confirmado de una mala hierba resistente a glifosato (Pratley *et al.*, 1996). Desde entonces, se han reportado casos adicionales de malas hierbas resistentes a glifosato en donde se incluyen *L. rigidum* (Australia, Sudáfrica y USA); *Eleusine indica* (Malasia); *L. multiflorum*

(Argentina, Brasil, Chile, USA y España); *Sorghum halepense* (Argentina y USA); hasta alcanzar un total de 23 especies a nivel mundial (Heap, 2012; Lee y Ngim, 2000; Powles *et al.*, 1998; Pratley *et al.*, 1999; Riar *et al.*, 2011; Vila-Aiub *et al.*, 2007). La primera especie anual de hoja ancha en desarrollar resistencia a glifosato fue *C. canadensis* en el cultivo de soja (*Glycine max*) en Delaware (USA) (VanGessel, 2001). Actualmente, *C. canadensis* está considerada una de las diez malas hierbas resistentes a herbicidas más importante ya que ha desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema II, bipiridilos, ureas, amidas, ALS y glicinas (Heap, 2012; Powles y Yu, 2010). *C. canadensis* tiene 26 reportes de resistencia a glifosato, 22 en USA, y solamente uno en Brasil, China, España y República Checa (Heap, 2012). Actualmente, *C. canadensis* resistente a glifosato está ampliamente distribuida debido a su rápida producción de semillas así como a la fácil diseminación por el viento, lo cual contribuye a una fácil dispersión a zonas agrícolas y no agrícolas (Buhler y Owen, 1997; Weaver, 2001).

Los mecanismos de resistencia plausibles a herbicidas en las malas hierbas son la absorción del herbicida (De Prado *et al.*, 2005), la translocación reducida del sitio de absorción al sitio de acción debido a la secuestación del herbicida en la vacuola (Ge *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010), rápida detoxificación metabólica del herbicida (Busi *et al.*, 2011; De Carvalho *et al.*, 2012; De Prado *et al.*, 2005), alteración del sitio de acción del herbicida (Powles y Yu, 2010) y la amplificación de genes (Gaines *et al.*, 2010). La investigación exhaustiva de los mecanismos potenciales de resistencia en *C. canadensis* ha mostrado que la absorción foliar del herbicida no tiene ningún efecto en la resistencia; esta ha sido atribuida a la secuestación del herbicida dentro de la vacuola del biotipo resistente (Ge *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2011), la cual reduce la translocación del herbicida glifosato en los biotipos resistentes (Koger y

Reddy, 2005; Shaner, 2009). En *C. canadensis*, actualmente no existe evidencia que la degradación metabólica juegue un papel importante en la resistencia a este herbicida.

El herbicida glifosato es ampliamente usado en España para controlar malas hierbas en cultivos perennes, antes de la siembra de cultivos anuales, así como también en áreas no agrícolas como orillas de camino, vías ferroviarias y áreas de recreación (Urbano *et al.*, 2007).

3.1. Objetivos

Los objetivos específicos de este trabajo fueron a) evaluar la eficacia de glifosato en diferentes poblaciones de *C. canadensis* del sur de España; b) cuantificar la resistencia a glifosato en biotipos R y S seleccionados; c) comparar la retención foliar, acumulación de ácido shiquímico, absorción-translocación de ^{14}C -glifosato y el metabolismo del herbicida glifosato en biotipos R y S de *C. canadensis* como posibles factores que confieren resistencia en esta mala hierba.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Herbicidas

El ^{14}C -glifosato (actividad específica, 273.8 MBq mmol⁻¹; 95% de pureza) fue proporcionado por American Radiolabeled Chemicals, Inc. (Saint Louis, MO, USA). Una formulación comercial de este herbicida (Roundup Energy 45% p/v SL) fue suministrado por Monsanto Agricultura España S. L., y se utilizó para todos los ensayos descritos posteriormente. Glifosato y AMPA obtenidos de Supelco (Bellefonte, USA), y sarcosina, formaldehído y glioxilato adquiridos en Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) fueron los estándares en grado analítico usados en los ensayos de metabolismo.

3.2.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Semillas de diferentes poblaciones de *C. canadensis* fueron colectadas en varias áreas donde el herbicida glifosato presentó faltas en el control de esta mala hierba. Para ello, las semillas fueron colectadas de 25 lugares diferentes en el sur de España, comprendiendo las provincias de Córdoba (C001-C003 de cítricos; C004-C014 de olivar), Huelva (C015–C016 de cítricos; C017 de fresa), Jaén (C018 de cítricos), Málaga (C019 de olivar) y Sevilla (C020-C025 de olivar). Se utilizaron nuevamente semillas de plantas susceptibles (S) caracterizadas en González-Torralva *et al.* (2010), para todos los experimentos descritos adelante.

Las semillas de cada población se sembraron en macetas (15 cm de ancho por 4.5 cm de altura) rellenas con turba húmeda y cubiertas con film transparente hasta su germinación. Las plántulas se transplantaron individualmente a macetas (7 por 7 por 7 cm) rellenas con una mezcla 1:1 v/v de turba:arena y fueron colocadas en condiciones controladas en

cámara de crecimiento a 28/18 °C (día/noche), con 16 h de fotoperiodo, una intensidad luminosa de 850 $\mu\text{mol m}^{-2}$ y un 80% de humedad relativa. Las plantas fueron regadas hasta capacidad de campo diariamente y no se utilizó ningún fertilizante. Este procedimiento se utilizó para todos los ensayos descritos posteriormente.

3.2.3. Evaluación de las diferentes poblaciones (*Screening*)

Dos semanas después del transplante, cuando las plantas alcanzaron el estadio de crecimiento BBCH 14-15 y de acuerdo a la escala fenológica BBCH (Hess *et al.*, 1997) éstas fueron tratadas con glifosato a una dosis de 238 g de ácido equivalente (ae) ha^{-1} (Roundup Energy 45% p/v SL) en la cámara de tratamientos del laboratorio. Se utilizó una boquilla de abanico plano (Tee Jet 8002 EVS) para asperjar las plantas a una presión de 200 kPa y una altura regulada de 50 cm sobre la superficie del suelo. La máquina se calibró para entregar un volumen de 200 L ha^{-1} . Se utilizaron un total de 20 plantas por población, de las cuales, 15 fueron asperjadas y 5 fueron mantenidas como control no tratado. Después de 21 días, fueron cortadas a ras de suelo, y se registró el peso fresco por planta, siendo expresado como porcentaje respecto a las plantas mantenidas como control. La población que mostró la menor reducción de peso fresco fue considerada como resistente (biotipo R). Se realizó una selección más fuerte del biotipo R mediante la aplicación de glifosato a una dosis de 360 g ae ha^{-1} , las semillas colectadas de las plantas sobrevivientes se utilizaron en los experimentos descritos posteriormente.

3.2.4. Ensayos dosis-respuesta

Cuando las plantas de ambos biotipos alcanzaron el estadio fenológico BBCH 14-15, se asperjó el herbicida glifosato utilizando la máquina de tratamientos anteriormente descrita. Las dosis utilizadas fueron 0, 25, 50,

75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 g ae ha⁻¹ para el biotipo R, mientras que para el biotipo S las dosis aplicadas fueron 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 g ae ha⁻¹. El tratamiento realizado fue completamente al azar con 5 repeticiones, usando 3 plantas por cada repetición. Tres semanas después del tratamiento, las plantas fueron cortadas a ras de suelo, registrando el peso fresco y expresándolo como porcentaje de peso fresco respecto al control no tratado.

3.2.5. Ensayos de acumulación de ácido shiquímico

Las plantas de los biotipos R y S en el estadio fenológico BBCH 14-15 fueron asperjadas con glifosato (200 g ae ha⁻¹ en un volumen de caldo de 200 L ha⁻¹), usando para ello la máquina de tratamientos anteriormente descrita. Se colectaron muestras de 50 mg de tejido fresco tanto de plantas tratadas como no tratadas, siendo inmediatamente congeladas en N₂ líquido a 24, 48, 72 96 y 168 h después del tratamiento. La acumulación de ácido shiquímico se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 380 nm en un instrumento Beckman DU-640 de acuerdo a la metodología de Singh y Shaner (1998) y modificado por Cromartie y Polge (2000). Se realizó una curva de calibrado con plantas no tratadas y una concentración conocida de ácido shiquímico. El experimento se diseñó completamente al azar con 3 repeticiones sobre 7 plantas tratadas y 3 no tratadas. Los resultados se expresaron en mg g⁻¹ de peso fresco.

3.2.6. Ensayos de retención foliar

La retención foliar del herbicida se cuantificó siguiendo el procedimiento descrito por González-Torralva *et al.* (2010). Las plantas de los biotipos R y S en el estadio de crecimiento BBCH14-15 fueron tratadas con una mezcla de glifosato a una dosis de 200 g ae ha⁻¹ más Na-fluoroscéina a

una concentración de 100 mg L⁻¹, usando las mismas condiciones de aplicación que se describen en los ensayos dosis respuesta. Una vez que la solución herbicida se secó por completo (aprox. 20 min) las plantas fueron cortadas a ras de suelo y lavadas con 50 mL de una solución NaOH 5 mM durante 30 s. Posteriormente, la solución de enjuague de cada planta fue filtrada y se midió la absorbancia a 490_{exc}/510_{em} nm con un fluorímetro Hitachi F-2500. Las plantas de cada biotipo fueron mantenidas en estufa a 80 °C durante 72 h para obtener el peso seco. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 4 repeticiones (3 plantas por cada repetición) por biotipo. Los resultados fueron expresados en µL de solución herbicida retenido g⁻¹ de peso seco.

3.2.7. Absorción y translocación de ¹⁴C-glifosato

Para los ensayos de absorción y translocación, el glifosato marcado (¹⁴C-glifosato) se mezcló con glifosato comercial para preparar una solución con una actividad específica de 0.834 kBq µL⁻¹ y una dosis de aplicación de 200 g ae ha⁻¹. Plantas de ambos biotipos en el estadio BBCH 14-15 fueron tratadas con una gota de 1.0 µL en la superficie adaxial de la tercera hoja usando una micropipeta (LabMate + HTL). Se aplicó a cada planta un total de 0.834 kBq. El herbicida marcado que no fue absorbido en la hoja tratada se removió con 3 mL de una solución agua:acetona (1:1 v/v) a 12, 24, 48, 72 y 96 h después de la aplicación de la gota. Posteriormente, las plantas fueron separadas en hoja tratada, resto de planta y raíz colocando cada parte vegetal en conos de celulosa. La solución de enjuague se mezcló con 7 mL de líquido de centelleo y fue cuantificada por espectrometría de centelleo líquida (LSS por sus siglas en inglés) en un contador de centelleo Beckman LS 6500. Por otro lado, los conos de celulosa con los diferentes tejidos vegetales se secaron durante 72 h a 60 °C y se quemaron en un oxidador biológico Packard Tri

Carb 307. El $^{14}\text{CO}_2$ correspondiente a todos los posibles metabolitos del glifosato (resultados solamente mostrados como ^{14}C -glifosato) fueron capturados y cuantificados en 18 mL de una mezcla 1:1 v/v de Carbo-Sorb E y Permafluor (Perkin–Elmer, Packard Bioscience BV). La radioactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo líquida, la cantidad de herbicida absorbido se expresó de la siguiente manera:

$$\% \text{ absorbido} = \frac{{}^{14}\text{C en muestra quemada}}{{}^{14}\text{C en muestra quemada} + {}^{14}\text{C presente en los lavados}} \times 100$$

3.2.8. Visualización del ^{14}C -glifosato

El movimiento en las plantas del ^{14}C -glifosato y sus posibles ^{14}C -metabolitos (resultados solamente mostrado como ^{14}C -glifosato) fue visualizada mediante películas de P (Storage Phosphor System: Cyclone, Perkin–Elmer Packard Bioscience BV). Plantas de los biotipos R y S en el estadio BBCH 14-15 fueron tratadas y removidas de las macetas en los mismos tiempos que se describen en los ensayos de absorción y translocación. Las raíces de cada planta se lavaron cuidadosamente; tras ello, las plantas enteras se montaron en papel filtro, se prensaron en papel periódico y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su desecación. Después, las plantas prensadas se colocaron junto a una película de P (25 x 12.5 cm) durante 6 h y fueron escaneadas para ver la translocación del herbicida. Se utilizaron tres plantas por biotipo.

3.2.9. Ensayos de metabolismo

Se trataron plantas de los biotipos R y S en el estadio BBCH 14-15 con glifosato a una dosis de 200 g ae ha⁻¹ en las condiciones descritas anteriormente, mientras que otras se mantuvieron sin tratar para ser usadas como control. La determinación de glifosato y sus metabolitos [ácido aminometilfosfonico (AMPA), glioxilato, sarcosina y

formaldehído] se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Rojano-Delgado *et al.* (2010b), a 24, 48, 72, 96 y 120 h después del tratamiento mediante electroforesis capilar de inversa polaridad usando un instrumento de Electroforesis Capilar 3D Agilent G1600A equipado con un diodo detector de red (DAD por sus siglas en inglés, longitud de onda 190-600 nm). Los metabolitos utilizados como estándar fueron: glifosato, AMPA, sarcosine, formaldehído y glioxilato. La masa foliar fue lavada con agua destilada, rápidamente congelada en N₂ líquido y almacenadas a -40 °C hasta su uso. El electrolito de fondo (BGE por sus siglas en inglés) consistió en ftalato de potasio 10 mM, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) 0.5 mM y 10% de acetonitrilo pH 7.5. La curva de calibración se realizó con plantas no tratadas y concentraciones conocidas de los diferentes estándares utilizados, los cuales fueron determinados en el electroferograma por el área de sus respectivos picos. El valor medio de glioxilato naturalmente producido por la planta fue restado del contenido medio de cada biotipo de acuerdo con Rojano-Delgado *et al.* (2010a). El experimento fue repetido 4 veces para cada biotipo, con 3 repeticiones por tiempo de colecta.

3.2.10. Análisis estadístico

Las curvas dosis-respuesta de cada especie fueron determinadas de acuerdo a Menendez *et al.* (2006). Los datos se agruparon y se ajustaron al siguiente modelo de regresión no lineal:

$$Y = c + \{(d - c) / [1 + (x / g)^b]\}$$

Donde Y es el peso fresco expresado como porcentaje respecto a las plantas no tratadas, c y d son coeficientes que pertenecen a las asíntotas

inferior y superior, respectivamente, b es la pendiente de la curva, g es la dosis de herbicida en el punto de inflexión medio entre las asíntotas superior e inferior y representa la ED_{50} y x (variable independiente) es la dosis del herbicida. El análisis de regresión se realizó con el programa SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc.). El Factor de Resistencia (RF) fue obtenido como la relación entre el ED_{50} del biotipo R y el ED_{50} del biotipo S.

Los datos obtenidos en los ensayos de retención foliar del herbicida fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA). El efecto del biotipo y el tiempo (HDT), además de su interacción en la acumulación de ácido shiquímico, absorción-translocación de ^{14}C -glifosato además del estudio de metabolismo entre los biotipos R y S fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA). El biotipo fue tratado como un factor fijo mientras que el tiempo se consideró como un factor aleatorio. Los datos en porcentaje fueron transformados (arcoseno raíz cuadrada) antes del análisis con el fin de satisfacer las hipótesis de normalidad. Cuando se requirió, la prueba de Tukey HSD al 5% de probabilidad se utilizó para la separación de las medias. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa Statistix (versión 8.0) (Analytical Software, United States of America).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Evaluación de las diferentes poblaciones (Screening)

La reducción del peso fresco estuvo en el rango del 9 hasta el 99%, los biotipos C004 (muestra colectada en olivar en la provincia de Córdoba), C002 (muestra colectada en cítricos en la provincia de Córdoba) y C024 (muestra colectada en olivar en la provincia de Sevilla) mostraron la menor reducción de peso fresco respecto al control no tratado (Fig. 3-1). El biotipo C004 fue catalogado como R y usado en todos los ensayos descritos posteriormente después de una selección más fuerte, como se explica en la parte de Materiales y Métodos.

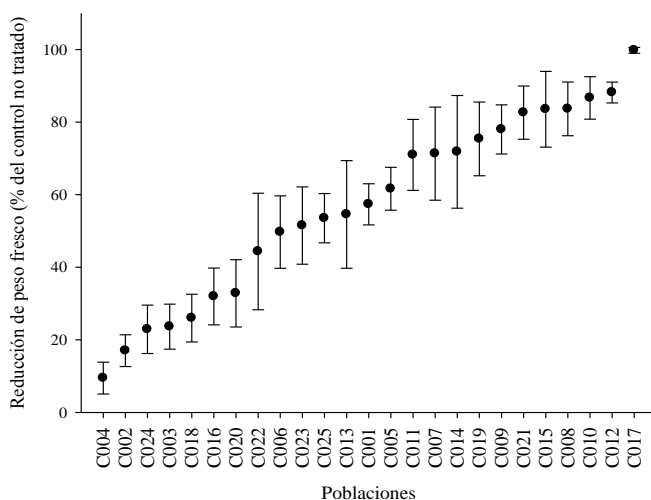


Figura 3- 1. Reducción del peso fresco en 25 poblaciones de *C. canadensis* 3 semanas después de la aplicación de glifosato a una dosis de 238 g ae ha⁻¹ en el estadio BBCH 14-15. Las barras verticales corresponden al error estándar.

3.3.2. Ensayos dosis-respuesta con los biotipos seleccionados

Las plantas de ambos biotipos en condiciones controladas y en el estadio de roseta (BBCH 14-15) mostraron un ED_{50} bajo ($50.7 \text{ g ae ha}^{-1}$) para el biotipo S; sin embargo en el biotipo R el valor encontrado fue mayor (ED_{50} : $311.2 \text{ g ae ha}^{-1}$). De los datos anteriores obtenemos que el biotipo R es 6.1 veces más resistente que el biotipo S (Fig. 3-2).

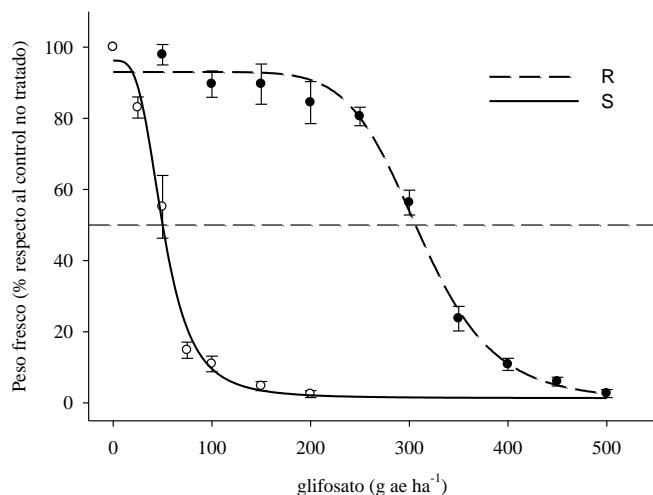


Figura 3- 2. Curva dosis-respuesta de *C. canadensis* sensible (S) y resistente (R) al herbicida glifosato, tratados en el estadio de crecimiento BBCH 14-15. Los datos fueron obtenidos 21 días después del tratamiento. Barras verticales \pm error estándar de la media.

3.3.3. Acumulación de ácido shiquímico

La acumulación de ácido shiquímico excedió los niveles iniciales después de la aplicación del herbicida. Ambos biotipos acumularon cantidades similares de ácido shiquímico de 24 a 72 h después del tratamiento. Después de este punto, sin embargo, la acumulación de ácido shiquímico fue diferente (interacción biotipo x tiempo, $P = 0.0024$) y aumentó en

más de un 60% en el biotipo S, mientras que en el biotipo R se redujo en un 40.2% (Fig. 3-3). La acumulación de ácido shiquímico se redujo de 96 hasta las 168 h después del tratamiento en el biotipo R, por el contrario se incrementó considerablemente de 72 a 168 h después del tratamiento en las plantas del biotipo S. El biotipo R acumuló 1.6 y 4.6 veces menos ácido shiquímico que el biotipo S a 96 y 168 h después del tratamiento, respectivamente. De acuerdo al análisis de varianza unifactorial, se detectaron diferencias significativas ($P = 0.0085$) entre ambos biotipos a 24 y 168 h después del tratamiento (Fig. 3-3).

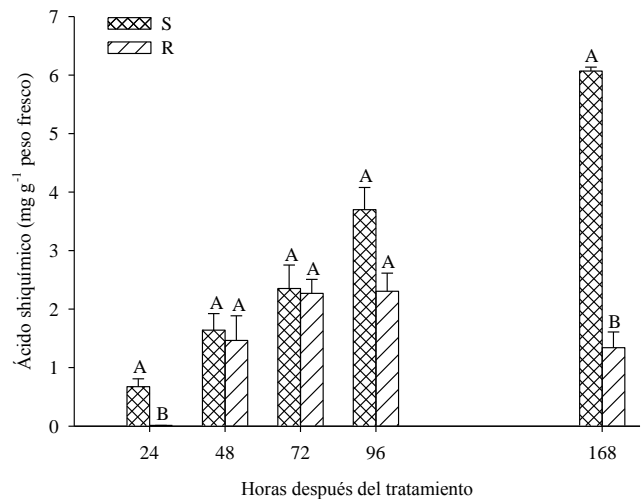


Figura 3- 3. Acumulación de ácido shiquímico en biotipos susceptibles y resistentes de *C. canadensis* a 24, 48, 72, 96 y 168 h después de la aplicación de glifosato a una dosis de 200 g ae ha⁻¹. Para cada tiempo, los valores medios mostrando la misma letra no son estadísticamente diferente de acuerdo al análisis de varianza unifactorial. Barras verticales \pm error estándar de las medias.

3.3.4. Ensayos de retención Foliar

La comparación de medias al nivel $P = 0.05$ no reveló diferencias significativas entre los biotipos R y S, los cuales retuvieron $768 (\pm 74)$ y $779 (\pm 51)$ μL de solución herbicida por g^{-1} de peso seco, respectivamente. Por lo tanto, la retención foliar del herbicida no tiene ninguna influencia en la resistencia a glifosato en este biotipo R.

3.3.5. Absorción y translocación de ^{14}C -glifosato

La absorción de ^{14}C -glifosato se incrementó respecto al tiempo y alcanzó la absorción máxima a 96 h después del tratamiento en ambos biotipos, tiempo en que el biotipo R había absorbido 70.7%, y el biotipo S 62.3% de todo el herbicida aplicado (Fig. 3-4). De acuerdo al análisis de varianza, en ambos biotipos no se encontraron diferencias significativas en la absorción de ^{14}C -glifosato (interacción biotipo x tiempo, $P = 0.6598$) o en el porcentaje absorbido (factor biotipo, $P = 0.3282$). Estos resultados sugieren que una absorción diferencial del herbicida no está operando como un mecanismo que explique la supervivencia de las plantas R al tratamiento con glifosato.

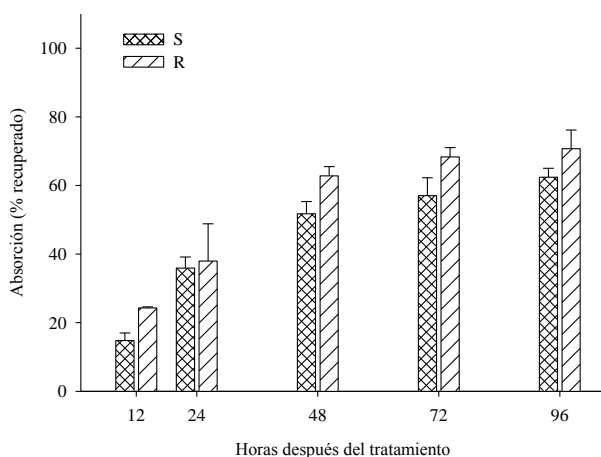


Figura 3- 4. Absorción de ^{14}C -glifosato en biotipos S y R de *C. canadensis* a través del tiempo. Ambos biotipos no difirieron estadísticamente en la absorción del herbicida de acuerdo al análisis de varianza. Barras verticales \pm error estándar de las medias.

Sin embargo, los ensayos de translocación revelaron diferencias marcadas entre biotipos. Esto es, el 85.62% de ^{14}C -glifosato absorbido permaneció en la hoja tratada del biotipo S a 12 h después del tratamiento, el 7.66 y 6.75% se translocó al resto de la planta y raíz (Tabla 3-1). Por otro lado, el 87.41% del ^{14}C -glifosato absorbido permaneció en la hoja tratada y solamente se translocó 4.66% a las raíces en el biotipo R. Las diferencias se hicieron más notables con el paso del tiempo, especialmente en las proporciones del ^{14}C -glifosato absorbido y translocado de la hoja tratada a las raíces 96 h después del tratamiento, tiempo en el cual el 16.09 y 20.71% del ^{14}C -glifosato absorbido por el biotipo S se había translocado al resto de la plantas y raíces, respectivamente. Por el contrario, solamente 9.77% y 10.79% del ^{14}C -glifosato absorbido por el biotipo R fue translocado al resto de la planta y raíces, respectivamente. Estas

diferencias fueron estadísticamente diferentes en ambos casos, tanto para la cantidad de herbicida marcado que permaneció en la hoja tratada ($P = 0.0308$) como para el herbicida translocado a las raíces ($P = 0.0145$). Estos resultados sugieren una translocación diferente en el biotipo R (Tabla 3-1).

Tabla 3- 1. Translocación de ^{14}C -glifosato en los biotipos R y S de *C. canadensis*. El tratamiento se realizó cuando las plantas alcanzaron el estadio de roseta (BBCH 14-15).

Biotipo	Translocación (% absorbido) ^a			
	HDT	Hoja tratada	Resto de planta	Raíz
S	12	85.62 ± 2.42AB	7.66 ± 2.17A	6.75 ± 1.11B
	24	82.32 ± 1.21AB	8.25 ± 2.93A	9.44 ± 1.49B
	48	81.37 ± 3.31AB	9.16 ± 1.38A	9.47 ± 2.33B
	72	76.97 ± 1.38B	9.86 ± 1.30A	13.17 ± 0.83AB
	96	63.21 ± 1.29C	16.09 ± 4.02A	20.71 ± 4.06A
R	12	87.41 ± 2.88A	7.94 ± 0.48A	4.66 ± 2.39B
	24	84.79 ± 4.39AB	9.33 ± 2.57A	5.88 ± 2.82B
	48	83.62 ± 0.41AB	8.90 ± 1.57A	7.51 ± 1.31B
	72	81.43 ± 3.28AB	9.61 ± 1.87A	8.97 ± 2.80B
	96	79.44 ± 1.03AB	9.77 ± 1.11A	10.79 ± 1.13B

^a Medias dentro de una misma columna seguida de la misma letra no son significativamente diferentes al 5% de probabilidad, determinado por la prueba de Tukey. Valor medio ± error estándar.

3.3.6. Visualización del ^{14}C -glifosato

El movimiento del herbicida marcado entre ambos biotipos fue visualizado mediante películas de P. Visualmente, no existieron diferencias de 12 a 72 h después del tratamiento (imágenes no mostradas). Sin embargo, a 96 h después del tratamiento, la evaluación visual de la autoradiografía mostró un mayor movimiento del herbicida de la hoja tratada al resto de la planta y raíz en el biotipo S, pero no en el biotipo R. En el biotipo R, el ^{14}C -glifosato absorbido permaneció principalmente en la hoja tratada y, como se ha demostrado en los ensayos de translocación, la cantidad de herbicida que se movió a la raíz fue diferente entre ambos biotipos, existiendo una menor acumulación de ^{14}C -glifosato en las raíces en el biotipo R respecto al S (Fig. 3-5).

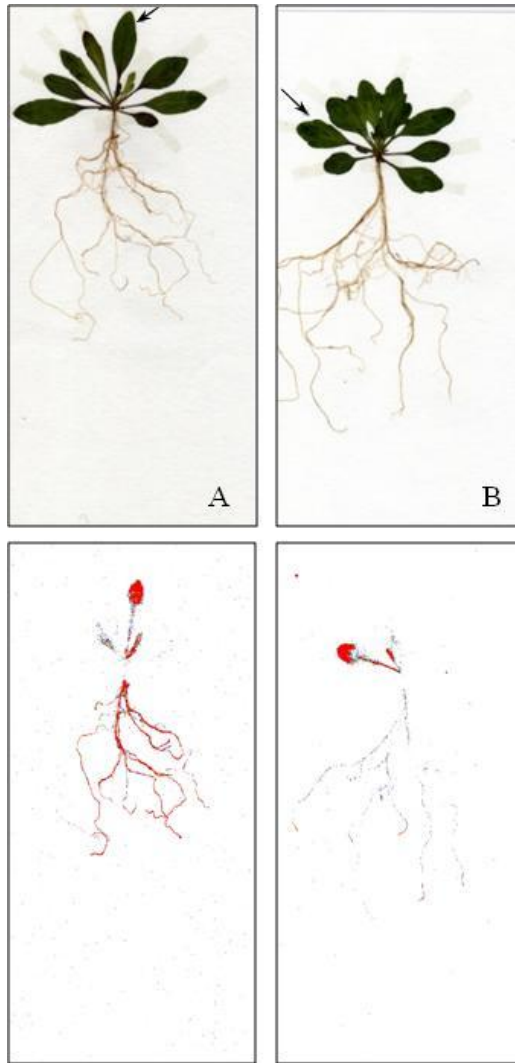


Figura 3- 5. Imágenes representativas donde se observa el movimiento de ^{14}C -glifosato en biotipos S (A) y R (B) de *C. canadensis* a 96 h después del tratamiento. Una coloración roja de mayor intensidad indica mayor concentración de ^{14}C -glifosato. Las flechas (arriba) indican el sitio de aplicación del ^{14}C -glifosato.

3.3.7. Metabolismo de glifosato

El estudio del metabolismo de glifosato reveló diferencias significativas entre ambos biotipos de *C. canadensis*. El metabolismo gradual de glifosato en el biotipo R llevó a su completa desaparición a 96 h después del tratamiento (Fig. 3-6; Tabla 3-2); mientras que el herbicida desapareció más lentamente en el biotipo S, 41.43 nmol g⁻¹ de peso fresco de la cantidad aplicada permaneció en las plantas 120 h después del tratamiento (Tabla 3-2). Fueron detectados dos metabolitos de glifosato [AMPA (7.2 nmol g⁻¹ de peso fresco) y sarcosina (8.1 nmol g⁻¹ de peso fresco)] en el biotipo R a 72 h después del tratamiento. Los metabolitos alcanzaron la cantidad de 6.9 nmol g⁻¹ de peso fresco (AMPA) y 12.4 nmol g⁻¹ de peso fresco (sarcosina) a 120 h después del tratamiento (Tabla 3-2). Como se puede observar, la degradación del glifosato no corresponde al 100% con la aparición de metabolitos, siendo capaz de justificar la translocación y la degradación física (lixiviación, fotodegradación) de glifosato. Estos resultados sugieren que el biotipo R tiene un metabolismo más rápido que el biotipo S, transformando el glifosato en metabolitos: AMPA, glioxilato y sarcosina, reduciendo así la cantidad de glifosato que podría alcanzar el sitio diana (*EPSPS*). Esta es la primera vez que el metabolismo de glifosato se describe participando en *C. canadensis* resistente a este herbicida.

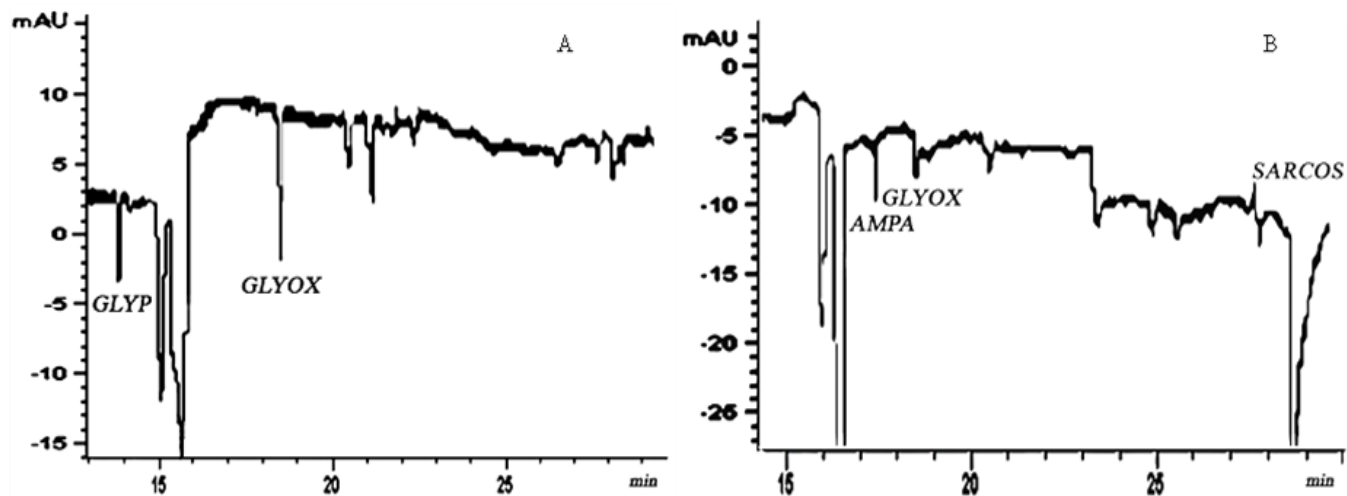


Figura 3- 6. Electroferogramas obtenidos de los biotipos S (A) y R (B) de *C. canadensis* tratados con glifosato a la dosis de 200 g ae ha⁻¹, 96 h después del tratamiento. GLYP: glifosato; GLYOX: glioxilato; AMPA: ácido aminometilfosfónico; SARCOS; sarcosina.

Tabla 3- 2. Metabolitos del herbicida glifosato encontrados en plantas S y R de *C. canadensis*. Ambos biotipos fueron tratados en el estadio BBCH 14-15 a una dosis de 200 g ae ha⁻¹.

Biotipo	Metabolitos (nmol g ⁻¹ peso fresco) ^a				
	HDT	glifosato	glioxilato	AMPA	sarcosina
S	24	91.01 ± 1.64 A	3.52 ± 0.84 C	ND	ND
	48	86.20 ± 1.17 AB	3.18 ± 1.13 C	ND	ND
	72	71.05 ± 1.56 C	7.97 ± 1.43 C	ND	ND
	96	54.44 ± 1.61 D	24.53 ± 2.24 B	ND	ND
	120	41.43 ± 1.32 E	46.47 ± 2.04 A	ND	ND
R	24	81.34 ± 2.26 B	-18.93 ± 3.36 D	ND	ND
	48	28.50 ± 3.02 F	-45.63 ± 2.68 E	ND	ND
	72	14.11 ± 2.66 G	-49.94 ± 2.62 E	7.25 ± 0.66 A	8.12 ± 0.99 A
	96	ND	-23.55 ± 2.30 D	7.19 ± 1.45 A	12.22 ± 2.64 A
	120	ND	7.07 ± 1.39 C	6.85 ± 2.05 A	12.40 ± 3.54 A

^aMedia dentro de una misma columna seguida de la misma letra no son significativamente diferente al 5% de probabilidad, determinada por la Prueba de Tukey. Media ± error estándar de la media. ND: No detectado.

3.4. DISCUSIÓN

La evaluación de las diferentes poblaciones de *C. canadensis* colectadas en el sur de España mostró diferentes grados de sensibilidad al herbicida glifosato. Estos resultados muestran la gran diversidad de los biotipos de *C. canadensis*, por lo tanto, pueden estar involucrados más de un mecanismo de resistencia al herbicida glifosato.

Los ensayos dosis respuesta confirmaron la resistencia de *C. canadensis* al herbicida glifosato, el Factor de Resistencia (FR = 6.1) observado es similar a los reportados por Dinelli *et al.* (2006) (FR = 4-4.7), pero es menor que los reportados por Koger *et al.* (2004) y VanGessel (2001) con el FR en el rango de 8 a 13 veces más resistente que el correspondiente biotipo S.

Basado en algunos reportes (Dinelli *et al.*, 2006; Shrestha *et al.*, 2007; VanGessel *et al.*, 2009), *C. canadensis* es más susceptible en el estadio de roseta que en estadios avanzados de crecimiento. Una explicación plausible de nuestro bajo ED₅₀ en ambos biotipos es que las plantas fueron tratadas en un estadio temprano de crecimiento (4-6 hojas, BBCH 14-15), cuando las plantas tienen una mayor actividad en la biosíntesis del ácido shiquímico (Shaner *et al.*, 2005).

La acumulación de ácido shiquímico en el biotipo S a 7 días después del tratamiento fue similar a otros valores previamente reportados por Mueller *et al.* (2008), estos autores compararon varias malas hierbas y encontraron que *C. canadensis* acumuló aproximadamente 6000 µg de ácido shiquímico g⁻¹ de peso fresco. Una mayor acumulación de ácido shiquímico confirma la gran sensibilidad del biotipo S al herbicida

glifosato comparado con el biotipo R. Resultados similares fueron reportados en la República Checa por Chodová *et al.* (2009), donde la acumulación de ácido shiquímico entre los biotipos R y S no fue significativamente diferente 72 h después del tratamiento pero, de 72 a 168 h después del tratamiento la acumulación disminuyó más de 4 veces en las plantas R, y se incrementó aproximadamente 3 veces en el biotipo S.

La retención foliar del herbicida es una medida de la cantidad de solución herbicida que puede penetrar en las plantas además es un buen indicador de la eficacia del herbicida (Chachalis *et al.*, 2001; Menendez *et al.*, 2011; Michitte *et al.*, 2007; Norsworthy *et al.*, 2001; Wang y Liu, 2007). En nuestros ensayos, la retención foliar no se encontró como un mecanismo de resistencia entre ambos biotipos. Una conclusión similar fue reportada previamente por Feng *et al.* (2004) quienes compararon biotipos R y S al herbicida glifosato en USA.

La absorción de ^{14}C -glifosato no juega ningún rol en el mecanismo de resistencia de *C. canadensis* (Dinelli *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2004; Koger y Reddy, 2005) y de otras especies como *L. multiflorum* (Perez-Jones *et al.*, 2007). En nuestros ensayos, la reducida translocación de ^{14}C -glifosato en el biotipo R está en concordancia con resultados previos encontrados de otros autores (Dinelli *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2004; Koger y Reddy, 2005; Perez-Jones *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009).

La degradación y transformación de glifosato ha sido examinada como un mecanismo potencial de resistencia por varios investigadores (Dinelli *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2004; Lorraine-Colwill *et al.*, 2002). El herbicida glifosato es enzimáticamente metabolizado a otros compuestos no tóxicos como glioxilato, sarcosina, formaldehído

(Rueppel *et al.*, 1977; Rueppel *et al.*, 1975) y AMPA, un compuesto medianamente tóxico. El glioxilato, el cual proviene de la degradación de glifosato, del ciclo del glioxilato y de la fotorespiración en plantas, fue el mayor metabolito en ambos biotipos (Pedotti *et al.*, 2009; Weber, 2006). Nuestros resultados claramente muestran el metabolismo de glifosato en el biotipo R. Sin embargo, han sido reportados resultados contrarios para las especies resistentes *C. canadensis* y *L. rigidum* de USA, donde la degradación de glifosato a compuestos no tóxicos no se encontró como el mecanismo de resistencia (Dinelli *et al.*, 2006; Duke, 2011; Feng *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2004; Lorraine-Colwill *et al.*, 2002). Sin embargo, biotipos resistentes a glifosato de *Digitaria insularis* han mostrado su habilidad para degradar glifosato a AMPA, glioxilato y sarcosina (De Carvalho *et al.*, 2012). En un estudio reciente sobre plantas de *Amaranthus retroflexus*, se encontró glifosato y pequeñas cantidades de AMPA, pero no se detectaron ni sarcosina o formaldehído (Rojano-Delgado *et al.*, 2012). Sin embargo, otros autores trabajando con plantas tolerantes a glifosato (*Ipomoea purpurea*, *Convolvulus arvensis*, *Clitoria ternatea*, *Neonotonia wightii* y *Mucuna pruriens*) han demostrado la habilidad de estas plantas para metabolizar glifosato a AMPA, sarcosina y glicina (Cruz-Hipolito *et al.*, 2011; Rojano-Delgado *et al.*, 2012; Sandberg *et al.*, 1980; Sprankle *et al.*, 1978).

En resumen, todos los resultados obtenidos en este trabajo apoyan el mecanismo de resistencia propuesto en *C. canadensis* de España. Más que la retención foliar y la absorción del herbicida, los mecanismos de resistencia se deben a la reducida translocación, probablemente debido a la secuestación del herbicida en la vacuola como ha demostrado Ge *et al.* (2010; 2011) y al metabolismo de glifosato en el biotipo R.

3.5. REFERENCIAS

- Bradshaw, L.D., Padgett, S.R., Kimball, S.L. & Wells, B.H. (1997). Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology* 11: 189-198.
- Buhler, D.D. & Owen, M.D.K. (1997). Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 45: 98-101.
- Busi, R., Vila-Aiub, M.M. & Powles, S.B. (2011). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity* 106: 817-824.
- Cromartie, T.H. & Polge, N.D. (2000). An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. *Proceedings of the Weed Science Society of America* 40: 291.
- Cruz-Hipolito, H., Rojano-Delgado, A., Domínguez-Valenzuela, J.A., Heredia, A., De Castro, M.D.L. & De Prado, R. (2011). Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant and Soil* 347: 221-230.
- Chachalis, D., Reddy, K.N., Elmore, C.D. & Steele, M.L. (2001). Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among *Ipomoea* species and smallflower morningglory. *Weed Science* 49: 628-634.
- Chodova, D., Salava, J., Martincová, O. & Cvikrova, M. (2009). Horseweed with reduced susceptibility to glyphosate found in the Czech Republic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6957-6961.
- Dauer, J.T., Mortensen, D.A. & Vangessel, M.J. (2007). Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *Journal of Applied Ecology* 44: 105-114.

- De Carvalho, L.B., Alves, P.L.D.C.A., González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H.E., Rojano-Delgado, A.M., De Prado, R., Gil-Humanes, J., Barro, F. & Luque De Castro, M.D. (2012). Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 615-622.
- De Prado, J.L., Osuna, M.D., Heredia, A. & De Prado, R. (2005). *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2185-2191.
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. & Barnes, J. (2006). Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86: 30-41.
- Duke, S.O. (2011). Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5835-5841.
- Feng, P.C.C., Pratley, J.E. & Bohn, J.A. (1999). Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 47: 412-415.
- Feng, P.C.C., Tran, M., Chiu, T., Sammons, R.D., Heck, G.R. & Cajacob, C.A. (2004). Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): Retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52: 498-505.
- Gaines, T.A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S.T., Shaner, D.L., Nissen, S.J., Patzoldt, W.L., Tranel, P.J., Culpepper, A.S., Grey, T.L., Webster, T.M., Vencill, W.K., Sammons, R.D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J.E. & Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 1029-1034.

- Ge, X., André d'Avignon, D., Ackerman, J.J.H. & Douglas Sammons, R. (2010). Rapid vacuolar sequestration: The horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science* 66: 345-348.
- Ge, X., d'Avignon, D.A., Ackerman, J.J., Duncan, B., Spaur, M.B. & Sammons, R.D. (2011). Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: Low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ^{31}P NMR. *Pest Management Science* 67: 1215-1221.
- González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H., Bastida, F., Mülleder, N., Smeda, R.J. & De Prado, R. (2010). Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4361-4366.
- Heap, I. (2012). International Survey of Herbicide Resistant Weeds. www.weedscience.org.
- Hess, M., Barralis, G., Bleiholder, H., Buhr, L., Eggers, T., Hack, H. & Stauss, R. (1997). Use of the extended BBCH scale - General for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research* 37: 433-441.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J. & Herberger, J. (Eds) (1997). *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. Wiley.
- Koger, C.H., Poston, D.H., Hayes, R.M. & Montgomery, R.F. (2004). Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technology* 18: 820-825.
- Koger, C.H. & Reddy, K.N. (2005). Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 53: 84-89.
- Lee, L.J. & Ngim, J. (2000). A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. *Pest Management Science* 56: 336-339.

- Lorraine-Colwill, D.F., Powles, S.B., Hawkes, T.R., Hollinshead, P.H., Warner, S.A.J. & Preston, C. (2002). Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74: 62-72.
- Menendez, J., Bastida, F. & De Prado, R. (2006). Resistance to chlortoluron in a downy brome (*Bromus tectorum*) biotype. *Weed Science* 54: 237-245.
- Menendez, J., Camacho, D., Fernandez-Cerejido, M.C. & Bastida, F. (2011). Effect of tank-mixed blended green adjuvants on glyphosate efficacy in four winter crop weed species. *Weed Research* 51: 344-352.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santaella, J.P. & Gauvrit, C. (2007). Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science* 55: 435-440.
- Mueller, T.C., Ellis, A.T., Beeler, J.E., Sharma, S.D. & Singh, M. (2008). Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. *Weed Research* 48: 455-460.
- Nandula, V.K., Reddy, K.N., Rimando, A.M., Duke, S.O. & Poston, D.H. (2007). Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3540-3545.
- Norsworthy, J.K., Burgos, N.R. & Oliver, L.R. (2001). Differences in weed tolerance to glyphosate involve different mechanisms. *Weed Technology* 15: 725-731.
- Pedotti, M., Rosini, E., Molla, G., Moschetti, T., Savino, C., Vallone, B. & Pollegioni, L. (2009). Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 284: 36415-36423.

- Perez-Jones, A., Park, K.W., Polge, N., Colquhoun, J. & Mallory-Smith, C.A. (2007). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226: 395-404.
- Powles, S.B., Lorraine-Colwill, D.F., Dellow, J.J. & Preston, C. (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science* 46: 604-607.
- Powles, S.B. & Yu, Q. (2010). Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61: 317-347.
- Pratley, J., Baines, P., Eberbach, R., Incerti, M. & Broster, J. (1996). Glyphosate resistance in annual ryegrass. In *11th Annual Conference Grasslands Society of New South Wales* (Eds J. Virgona and D. Michalk). Wagga, Wagga, Australia: The Grasslands Society of New South Wales.
- Pratley, J., Urwin, N., Stanton, R., Baines, P., Broster, J., Cullis, K., Schafer, D., Bohn, J. & Krueger, R. (1999). Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. I. Bioevaluation. *Weed Science* 47: 405-411.
- Riar, D.S., Norsworthy, J.K., Johnson, D.B., Scott, R.C. & Bagavathiannan, M. (2011). Glyphosate resistance in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. *Weed Science* 59: 299-304.
- Rojano-Delgado, A.M., Cruz-Hipolito, H., De Prado, R., Luque De Castro, M.D. & Franco, A.R. (2012). Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. *utilis* plants. *Phytochemistry* 73: 34-41.
- Rojano-Delgado, A.M., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. & De Prado, R. (2010a). Screening and confirmatory analysis of glyoxylate: a biomarker of plants resistance against herbicides. *Talanta* 82: 1757-1762.

- Rojano-Delgado, A.M., Ruiz-Jiménez, J., De Castro, M.D.L. & De Prado, R. (2010b). Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed-polarity CE with indirect absorptiometric detection. *Electrophoresis* 31: 1423-1430.
- Rueppel, M.L., Brightwell, B.B., Schaefer, J. & Marvel, J.T. (1977). Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25: 517-528.
- Rueppel, M.L., Marvel, J.T. & Suba, L.A. (1975). The metabolism of N-phosphonomethyl glycine in corn, soybeans and wheat. In 170th American Chemical Society Meeting.
- Sandberg, C.L., Meggitt, W.F. & Penner, D. (1980). Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C-glyphosate in several weed species. *Weed Research* 20: 195-200.
- Shaner, D.L. (2009). Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Science* 57: 118-123.
- Shaner, D.L., Nadler-Hassar, T., Henry, W.B. & Koger, C.H. (2005). A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science* 53: 769-774.
- Shrestha, A., Hembree, K.J. & Va, N. (2007). Growth stage influences level of resistance in glyphosate-resistant horseweed. *California Agriculture* 61: 67-70.
- Singh, B.K. & Shaner, D.L. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology* 12: 527-530.
- Sprankle, P., Sandberg, C.L., Meggitt, W.F. & Penner, D. (1978). Separation of glyphosate and possible metabolites by thin-layer chromatography. *Weed Science* 26: 673-674.
- Steinruecken, H.C. & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate

- synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
- Urbano, J.M., Borrego, A., Torres, V., Leon, J.M., Jimenez, C., Dinelli, G. & Barnes, J. (2007). Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technology* 21: 396-401.
- VanGessel, M.J. (2001). Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science* 49: 703-705.
- VanGessel, M.J., Scott, B.A., Johnson, Q.R. & White-Hansen, S.E. (2009). Influence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) growth stage on response to glyphosate applications. *Weed Technology* 23: 49-53.
- Vila-Aiub, M.M., Balbi, M.C., Gundel, P.E., Ghersa, C.M. & Powles, S.B. (2007). Evolution of glyphosate-resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Science* 55: 566-571.
- Wang, C.J. & Liu, Z.Q. (2007). Foliar uptake of pesticides-Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 1-8.
- Weaver, S.E. (2001). The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 867-875.
- Weber, A.P.M. (2006). Synthesis, export and partitioning of the end products of photosynthesis. In *The structure and function of plastids*, 273–292 (Eds R.R. Wise and J.K. Hooper). Netherlands: Springer, Dordrecht.
- Yu, Q., Abdallah, I., Han, H., Owen, M. & Powles, S. (2009). Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta* 230: 713-723.
- Yu, Q., Huang, S. & Powles, S. (2010). Direct measurement of paraquat in leaf protoplasts indicates vacuolar paraquat sequestration as a

resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 104-109.

CAPÍTULO IV

**ALTERNATIVAS QUÍMICAS EN EL
CONTROL DE *C. canadensis* L. Cronq.
RESISTENTE A GLIFOSATO**

Resumen

Conyza canadensis es una mala hierba dicotiledónea de gran importancia en cultivos perennes como son olivar y cítricos. Durante los últimos años, se han reportado faltas en el control de esta mala hierba con el herbicida glifosato. Por tal razón, se realizaron ensayos de campo con diferentes mezclas de herbicidas para buscar la mejor solución química en el control de *C. canadensis* resistente a glifosato. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, han mostrado que *C. canadensis* se controla eficazmente en preemergencia mediante el uso de herbicidas como Flumioxazin, Oxyfluorfen, Pendimetalina, Fluometuron-Terbutilazina y Diflufenican los cuales en nuestros ensayos mostraron porcentajes de control elevados. En postemergencia temprana, *C. canadensis* fue controlada eficazmente incrementando la dosis comercial de glifosato a la máxima autorizada. Por otro lado, las mezclas Glifosato + Flazasulfuron; (MCPA + Glifosato); Glifosato + Saflufenacil + Adyuvante y Glifosato + Amitrol mostraron una eficacia mayor del 90%. La utilización de herbicidas quemantes como el diquat también mostró un control eficaz de *C. canadensis*. El control de *C. canadensis* resistente a glifosato debe incluir la rotación de herbicidas, además de la utilización de herbicidas en preemergencia.

Abstract

Conyza canadensis is a very important dicot weed in perennial crops such as olives trees and citrus orchards. During the last years some claims about the low efficacy with herbicide glyphosate have been reported. In order to find the best chemical alternatives to control glyphosate resistant *C. canadensis* field trials were carried out using different herbicides mixtures. The results have shown that *C. canadensis* is perfectly controlled with the use of preemergent herbicides such as Flumioxazin, Oxifluorfen, Pendimethalin, Fluometuron-Terbuthylazine and Diflufenican, which, in our assays showed high control percentages. In early postemergence, *C. canadensis* was controlled using the maximum glyphosate authorized field rate. By other side, the mixtures glyphosate + flazasulfuron; (MCPA + Glyphosate); Glyphosate + Saflufenacil + Adjuvant and Glyphosate + Amitrol showed more than 90% of efficacy in the control of glyphosate resistant *C. canadensis*. Use of burndown herbicides such as diquat showed a great control efficacy on the glyphosate resistant *C. canadensis*. Control of glyphosate resistant *C. canadensis* should include the herbicide rotation and the use of preemergence herbicides.

4. INTRODUCCIÓN

El género *Conyza* spp. ha sido reportado como malas hierbas de importancia en más de 40 cultivos en 70 países (Holm *et al.*, 1997). En el territorio español han sido descritas seis especies en diferentes cultivos, pero solamente tres de ellas están ampliamente distribuidas y son las de mayor importancia en cultivos como cítricos y olivar: [*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.], [*Conyza canadensis* (L.) Cronq.] y [*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker = *Conyza albida* Willd. ex Spreng.] (Bastida *et al.*, 2005; Carretero, 2004; Saavedra y Pastor, 2002). En las tres especies, la emergencia de las plántulas se lleva a cabo principalmente en invierno (Recasens y Conesa, 2009) con la floración y producción de semillas en verano-otoño (Carretero, 2004).

La forma más común de controlar estas y otras malas hierbas es mediante el uso de herbicidas, principalmente glifosato. El glifosato inhibe la enzima EPSPS (5 enolpiruvil shikimato 3 fosfato sintasa) (Steinruecken y Amrhein, 1980). Los síntomas pueden aparecer entre los siete y catorce días después del tratamiento, el glifosato tiende a acumularse en las regiones meristemáticas de las plantas tratadas y como consecuencia existe una clorosis en estas regiones, seguido por una necrosis de los tejidos (Holt *et al.*, 1993).

El bajo coste por hectárea y su amplio espectro de control han hecho que el herbicida glifosato sea utilizado sin medida. Durante los últimos 5 años varias quejas acerca de la baja eficacia en el control de estas especies con el herbicida glifosato han sido reportadas, principalmente en cultivos con labranza mínima o no laboreo como son el olivar y cítricos. Esta presión

de selección, aunado a la restricción de moléculas impuesto por la comunidad europea, ha derivado en la resistencia de varias especies a este herbicida. En la actualidad, biotipos de las tres especies mencionadas han sido reportadas como resistentes al herbicida glifosato en el sur de España (González-Torralva *et al.*, 2009; Urbano *et al.*, 2007).

4.1. Objetivos

El principal objetivo de estos ensayos es determinar y comparar la mejor estrategia de control químico en *C. canadensis* resistente al herbicida glifosato. Lo anterior, mediante la aplicación de tratamientos herbicidas en diferentes cultivos, años y época de aplicación.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Generalidades de los ensayos de campo

Durante los diferentes ensayos realizados en distintos cultivos y épocas de aplicación el diseño experimental utilizado fue en bloques completamente al azar con tres repeticiones (B1, B2 y B3). Cada bloque se dividió en unidades experimentales de 10 m² (2 x 5 m) en los que se aplicaron los diferentes tratamientos herbicidas, a excepción de los ensayos del año 2011-2012, los cuales fueron de 21 m² (3 x 7 m). Para prevenir el solapamiento de los tratamientos, se dejó 1 m de distancia entre dichas unidades experimentales.

Para la aplicación de los diferentes tratamientos herbicidas en los años 2009 y 2010, se utilizó una mochila neumática equipada con 4 boquillas de abanico plano (API 11002), regulada a una presión de 200 kPa y un volumen de aplicación de 200 L ha⁻¹. Para el año 2012, los tratamientos herbicidas se realizaron con una mochila neumática equipada con 6 boquillas de abanico plano (API 11002), regulada a 200 kPa y se calibró a un volumen de aplicación de 400 y 200 L ha⁻¹ para los tratamientos de preemergencia y postemergencia, respectivamente.

4.2.1.1. Evaluación visual

La eficacia de los distintos tratamientos herbicidas se evaluó de forma visual a diferentes tiempos después de la aplicación. Para ello, se valoró de 0 a 100% de control, donde 0% corresponde a un control nulo y 100% representa un control total de la mala hierba, es decir, todas las plantas están muertas.

4.2.1.2. Evaluación cuantitativa

Para la evaluación cuantitativa de los diferentes tratamientos herbicidas, al final de las evaluaciones visuales se arrojó al azar sobre cada unidad experimental un cuadro de 0.25 m², se cortó a ras de suelo toda la biomasa presente y fue colocada en sobres de papel (25 x 35.5 cm). Posteriormente, los sobres se colocaron a 80 °C durante 96 h para obtener el peso seco.

Los datos obtenidos en las diferentes evaluaciones visuales, así como el peso seco de las evaluaciones cuantitativas al final de los ensayos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias mediante la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad, utilizando el programa Statistix (versión 8.0) (Analytical Software, United States of America).

4.2.2. Año 2009 cítricos

Los ensayos de campo se realizaron en la finca Navas de la Grulla (37° 42.745 N y 5° 25.246 O). Se trata de una finca con riego localizado, de tres años de antigüedad y plantada con naranja de la variedad Salustiana, la finca está ubicada en la provincia de Sevilla sobre la carretera nacional A-431, en el tramo municipal de Peñaflor y Lora del Río, aproximadamente a 60 km de la ciudad de Córdoba.

Los diferentes tratamientos herbicidas se realizaron el 27 de abril de 2009 y al momento de la aplicación, la cubierta vegetal estaba constituida en un 80% de *C. canadensis* y un 20% de *C. bonariensis*.

La eficacia de los herbicidas se evaluó visualmente a 15, 30, 45 y 60 días después del tratamiento. Se realizó la evaluación cuantitativa al final de las evaluaciones visuales.

En la Tabla 4-1 se muestran los diferentes tratamientos, dosis y abreviaturas que se usaran a través del capítulo IV.

Tabla 4- 1. Tratamientos herbicidas aplicados sobre la cubierta vegetal de *Conyza* spp. en la Finca Navas de La Grulla, dosis y abreviatura utilizada en el capítulo IV. Año 2009.

Tratamiento	Dosis ha ⁻¹	Abreviatura
Control	-----	Control
Glifosato	2160 g ia	Glifosato 2160
Glifosato	4320 g ia	Glifosato 4320
Flazasulfuron	200 g	Flazasulfuron 200
Glifosato + Flazasulfuron	2160 g ia + 200 g	Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200
Saflufenacil + Dash	20 g + 0.75%	Saflufenacil 20 + Dash 0.75%
Glifosato + Saflufenacil + Dash	2160 g ia + 20 g + 0.75%	Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%
Glifosato + Saflufenacil + Dash	2160 g ia + 20 g + 0.75%	Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *
** Saflufenacil + Dash	20 g + 0.75%	
(1440 g ia MCPA + 1440 g ia glifosato)	8 L	(MCPA 1440 + Glifosato 1440)
(1440 g ia MCPA + 1440 g ia glifosato) + glifosato	8 L + 720 g ia	(MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720
Glifosato + Saflufenacil + Aceite	2160 g ia + 20 g + 1%	Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1%

** Tratamiento realizado 15 días después de la primera aplicación en las mismas unidades experimentales.

4.2.3. Año 2010 olivar

Los tratamientos se llevaron a cabo en Ferreira (Portugal), en una finca de olivar (37° 58.798' N y 008° 10.979' O). En esta finca particularmente conocemos que *C. canadensis* presenta resistencia a glifosato por aplicaciones directas realizadas en años anteriores (resultados no mostrados).

Los diferentes tratamientos herbicidas fueron aplicados el 8 de mayo de 2010. Al momento de la aplicación la cubierta vegetal estaba formada en un 90% de *C. canadensis* y un 10% de *C. bonariensis*.

La eficacia de los distintos tratamientos herbicidas se evaluó visualmente a 15 y 30 días después de la aplicación, se realizó además la evaluación cuantitativa al final de las evaluaciones visuales.

En la Tabla 4-2 se muestran los distintos tratamientos, dosis y abreviatura que se usará en el capítulo IV.

Tabla 4- 2. Tratamientos herbicidas aplicados sobre la cubierta vegetal de *Conyza* spp. en Ferreira, Portugal, dosis y abreviatura utilizada en el capítulo IV. Año 2010.

Tratamiento	Dosis (ha ⁻¹)	Abreviatura
Control	-----	Control
Glifosato	2160 g ia	Glifosato 2160
Glifosato	4320 g ia	Glifosato 4320
Flazasulfuron	200 g	Flazasulfuron 200
Glifosato + Flazasulfuron	2160 g ia + 200 g	Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200
Saflufenacil + Dash	20 g + 0.75%	Saflufenacil 20 + Dash 0.75%
Glifosato + Saflufenacil + Dash	2160 g ia + 20 g + 0.75%	Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%
Glifosato + Saflufenacil + Dash	2160 g ia + 20 g + 0.75%	Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *
** Saflufenacil + Dash	20 g + 0.75%	
(1440 g ia MCPA + 1440 g ia glifosato)	8 L	(MCPA 1440 + Glifosato 1440)
(1440 g ia MCPA + 1440 g ia glifosato) + glifosato	8 L + 720 g ia	(MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720
Glifosato + Saflufenacil + Aceite	2160 g ia + 20 g + 1%	Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1%
Glifosato + Amitrol	2160 g ia + 1200 g ia	Glifosato 2160 + Amitrol 1200

**Tratamiento efectuado 10 días después de la primera aplicación (mayo 18 de 2010.) en las mismas unidades experimentales.

4.2.4. Año 2012 cítricos

Los ensayos de campo se establecieron en una finca de cítricos (37° 40.548 N y 5° 21.478 O) localizada en Palma del Río (Córdoba). Se trata de una finca con 6 años de antigüedad, con una extensión de 8 ha y plantada con la variedad Navel Power. Los árboles se encuentran en un marco de plantación de 6 x 4 m. Desde el establecimiento de la plantación el control de las malas hierbas ha incluido la aplicación de glifosato (1080 g ia ha⁻¹) + MCPA (900 g ia ha⁻¹) en los meses de marzo y octubre; mientras que glifosato (1080 g ia ha⁻¹) + diflufenican (150 g ia ha⁻¹) se ha aplicado en los meses de mayo y diciembre. La finca cuenta con un suelo arcillo-limoso, un 1.12% de materia orgánica y presenta un pH de 8.49.

Los tratamientos de preemergencia (A) y postemergencia (B) se aplicaron el 23 de enero y 29 de febrero de 2012, respectivamente. Al momento de la aplicación la cubierta vegetal estaba formada en un 60% de *C. canadensis* y un 40% de *C. bonariensis*.

En la Tabla 4-3 se muestran los diferentes tratamientos, dosis y época de aplicación de los distintos tratamientos herbicidas aplicados sobre *Conyza* spp.

Tabla 4- 3. Diferentes tratamientos aplicados sobre *Conyza* spp. resistente a glifosato en Palma del Río, Córdoba. Año 2012.

	Tratamiento	Dosis (g ia ha ⁻¹)	Época de aplicación
1	-Control no tratado	---	---
2	-Glifosato-sal de potasio	720	B
3	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
4	-Isoxaben	1000	A
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
5	-Pendimetalina	1980	A
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
6	-Flumioxazin	600	A
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
7	-Oxifluorfen	960	A
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
	-Amitrol	1440	B
8	-Tiocianato amónico	1260	B
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
9	-Flazasulfuron	50	B
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
10	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
	-Glufosinato de amonio	750	C
11	-Pendimetalina	1980	A
	-Diquat	800	B
	-Fluometuron	990	A
12	-Terbutilazina	990	A
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
13	-Diflufenican	320	A
	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
	-Sulfonilurea EXP.	50	B
14	-Surfactante	1000	B
	-Glifosato-sal de potasio	720	B
15	-MCPA	1080	B
	-Glifosato	1080	B

Continúa

	-MCPA	1080	B
16	-Glifosato	1080	B
	-MCPA	1080	C
	-Glifosato	1080	C
17	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
	-Fluroxipir	300	C
18	-Glifosato-sal de potasio	2160	B
	-Clopiralida	128	C

A: Preemergencia hasta el estadio de dos hojas.

B: estadio de roseta (9-10 hojas).

C: elongación del tallo (< 25 cm).

Para determinar la eficacia de control en cada tratamiento, se realizaron evaluaciones visuales a 30, 45 y 60 días después de la aplicación de los distintos tratamientos herbicidas. Al final de las evaluaciones visuales se realizó la evaluación cuantitativa.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Año 2009 cítricos

4.3.1.1. Evaluación visual

En la Fig. 4-1 y Tabla 4-4, se puede observar los resultados de las distintas evaluaciones realizadas sobre la cubierta vegetal de *Conyza* spp. Visualmente el mejor tratamiento a 15 días después de la aplicación fue Glifosato 4320, el cual presentó una buena eficacia de control (85%). Sin embargo, estadísticamente no existieron diferencias significativas entre los tratamientos Glifosato 2160 y (MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720. Por el contrario, los tratamientos que mostraron un control insatisfactorio de la cubierta vegetal fueron Flazasulfuron 200 y Saflufenacil 20 + Dash 0.75%. Estadísticamente no existieron diferencias entre los tratamientos Flazasulfuron 200; Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200 y Saflufenacil 20 + Dash 0.75% los cuales mostraron los menores porcentajes de control en esta fecha de evaluación.

Después de 30 días de la aplicación, los mejores tratamientos fueron Glifosato 4320, el cual mostró un 100% de control de la cubierta de *Conyza* spp.; Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *; (MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720 y Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200, estadísticamente no existieron diferencias entre estos tratamientos. Por otro lado, los tratamientos que en esta evaluación mostraron una baja eficacia en el control de la cubierta de *Conyza* spp. fueron: Flazasulfuron 200 y Saflufenacil 20 + Dash 0.75% (Fig. 4-1; Tabla 4-4).

A 45 días después de las aplicaciones, el mejor tratamiento sigue siendo Glifosato 4320. Los tratamientos Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% * y (MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720 siguen

manteniendo un buen porcentaje de control. El tratamiento Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200 ha incrementado notablemente el porcentaje de control (Fig. 4-1; Tabla 4-4). En general, en esta evaluación la mayoría de los tratamientos han presentado una buena eficacia siendo mayor al 50%. Sin embargo, los tratamientos Flazasulfuron 200 y Saflufenacil + Dash 0.75% siguen sin mostrar una buena eficacia en el control de *Conyza* spp.

En la última evaluación (60 DDT), visualmente los mejores tratamientos fueron: Glifosato 2160; Glifosato 4320; Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200; MCPA 1440 + Glifosato 1440 y (MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720 entre los cuales no existieron diferencias significativas. Los tratamientos que a esta fecha no mostraron buenos porcentajes de control fueron: Flazasulfuron 200 y Saflufenacil 20 + Dash 0.75% (Fig. 4-1; Tabla 4-4).

Respecto al herbicida saflufenacil, y comparando los distintos tratamientos realizados con este herbicida ya sea sólo o en mezcla, el mejor tratamiento fue Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% * posiblemente debido a que estas unidades experimentales fueron tratadas dos veces. En los tratamientos Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% y Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1%, la adición de Dash o Aceite no tuvo influencia en un mayor porcentaje de control al final de los ensayos (60 DDT) bajo las condiciones descritas. La mezcla Saflufenacil 20 + Dash 0.75% no presentó porcentajes aceptables de control sobre la cobertura de *Conyza* spp.

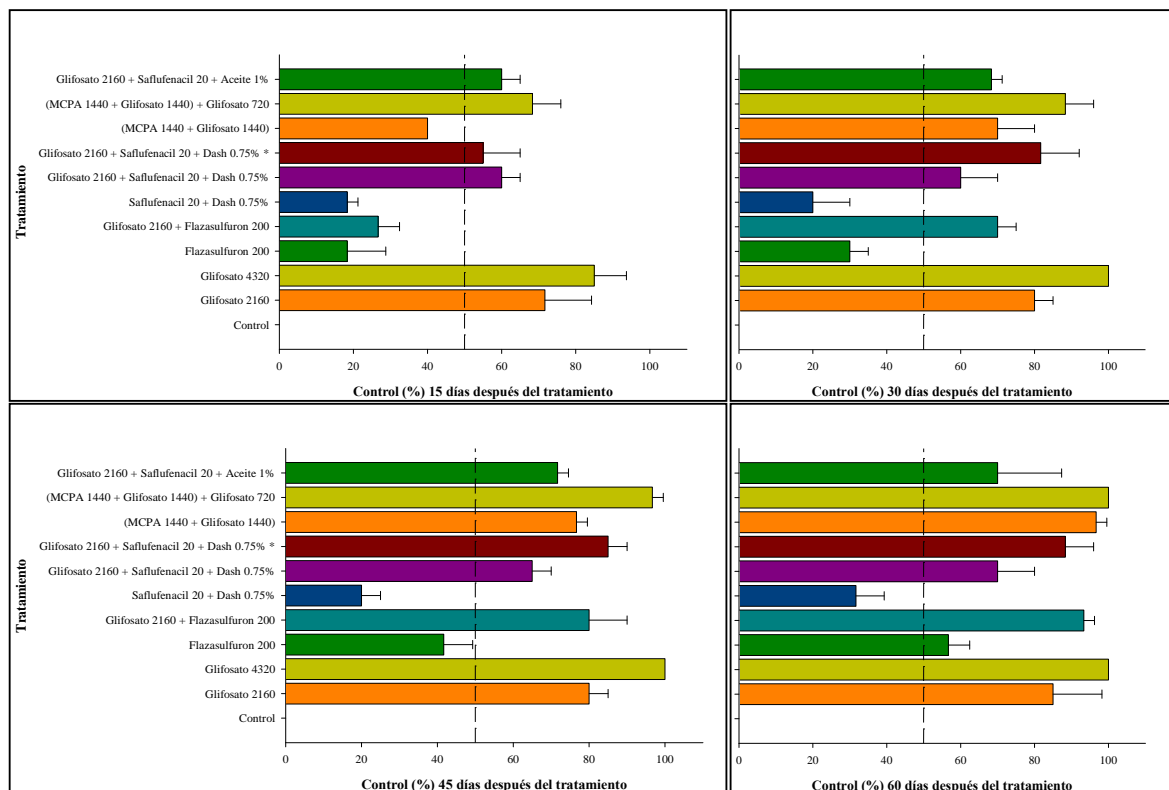


Figura 4- 1. Evaluaciones visuales (%) de los distintos tratamientos herbicidas en Navas de la Grulla. Año 2009.

Tabla 4- 4. Evaluación visual (%) de los distintos tratamientos realizados sobre *Conyza* spp. en la finca Navas de la Grulla. Año 2009.

Tratamiento	^a Días después del tratamiento			
	15	30	45	60
Control	0.0 ± 0.0 F	0.0 ± 0.0 F	0.0 ± 0.0 G	0.0 ± 0.0 E
Glifosato 2160	71.7 ± 12.6 AB	80.0 ± 5.0 BC	80.0 ± 5.0 C	85.0 ± 13.2 AB
Glifosato 4320	85.0 ± 8.7 A	100.0 ± 0.0 A	100.0 ± 0.0 A	100.0 ± 0.0 A
Flazasulfuron 200	18.3 ± 10.4 EF	30.0 ± 5.0 E	41.7 ± 7.6 E	56.7 ± 5.8 C
Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200	26.7 ± 5.8 DE	70.0 ± 5.0 BCD	80.0 ± 10.0 C	93.3 ± 2.9 A
Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	18.3 ± 2.9 EF	20.0 ± 10.0 E	20.0 ± 5.0 F	31.7 ± 7.6 D
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	60.0 ± 5.0 BC	60.0 ± 10.0 D	65.0 ± 5.0 D	70.0 ± 10.0 BC
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *	55.0 ± 10.0 BC	81.7 ± 10.4 ABC	85.0 ± 5.0 BC	88.3 ± 7.6 AB
(MCPA 1440 + Glifosato 1440)	40.0 ± 0.0 CD	70.0 ± 10.0 BCD	76.7 ± 2.9 CD	96.7 ± 2.9 A
(MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720	68.3 ± 7.6 AB	88.3 ± 7.6 AB	96.7 ± 2.9 AB	100.0 ± 0.0 A
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1%	60.0 ± 5.0 BC	68.3 ± 2.9 CD	71.7 ± 2.9 CD	70.0 ± 17.3 BC

^aMedias dentro de una misma columna seguida de la misma letra no son significativamente diferente al 5% de probabilidad determinada por la prueba de Tukey. Valores medios ± error estándar de la media.

4.3.1.2. Evaluación cuantitativa

El peso seco por m^2 no estuvo en concordancia con las evaluaciones visuales, ya que por ejemplo, comparando el tratamiento Glifosato 4320 el cual tuvo una eficacia del 100% a 60 DDT (evaluación visual) y un peso seco de 170 g m^2 , con el tratamiento Glifosato 2160 (eficacia en el control del 85%; 60 DDT) podemos observar que casi tuvieron la misma cantidad de peso seco al final del ensayo. Sin embargo, entre ambos tratamientos no existieron diferencias significativas en las evaluaciones visuales (Tabla 4-5, Fig 4-2).

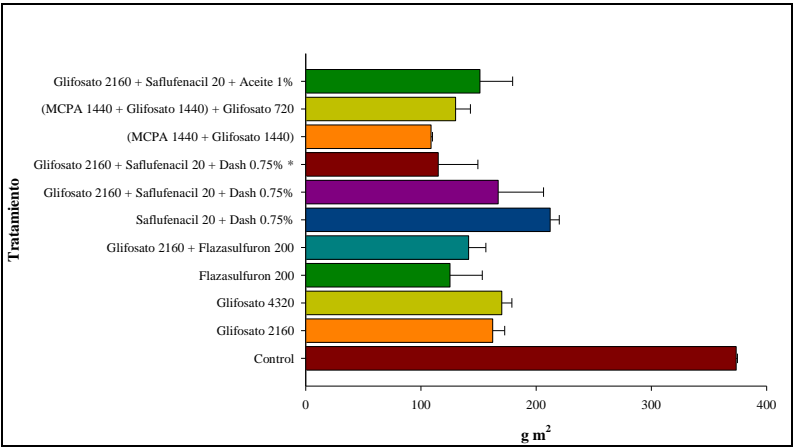


Figura 4- 2. Peso seco por m^2 de los diferentes tratamientos herbicidas realizados sobre *Conyza* spp. a 60 días después del tratamiento en la finca Navas de la Grulla. Año 2009.

El tratamiento (MCPA 1440 + Glifosato 1440) presentó el menor peso seco por m^2 (Tabla 4-5; Fig. 4-2). En este tratamiento el peso seco (g m^2) estuvo en concordancia con la eficacia observada.

De acuerdo a la comparación de medias los mejores tratamientos para controlar *Conyza* spp. fueron Glifosato 2160; Glifosato 4320; Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200; Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% * y (MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720. Sin embargo, no en todos los tratamientos estuvo en concordancia la evaluación visual y el peso seco respectivo de cada tratamiento. Lo anterior, es debido a la densidad diferente de plantas dentro de cada unidad experimental. El tratamiento Saflufenacil + Dash 0.75% mostró la mayor cantidad de peso seco (sólo por debajo del control), lo cual resulta algo esperado ya que este tratamiento durante las diferentes evaluaciones visuales no mostró una eficacia aceptable en el control de *Conyza* spp.

Tabla 4- 5. Peso seco por m² de los diferentes tratamientos herbicidas llevados a cabo sobre *Conyza* spp. a 60 días después del tratamiento en la finca Navas de la Grulla. Año 2009.

Tratamiento	^a Peso seco g m ²
Control	373.6 ± 1.1 A
Glifosato 2160	162.3 ± 10.4 BC
Glifosato 4320	170.1 ± 8.8 BC
Flazasulfuron 200	125.2 ± 28.1 C
Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200	141.4 ± 14.9 C
Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	212.2 ± 7.9 B
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	167.1 ± 39.4 BC
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *	115.1 ± 34.4 C
(MCPA 1440 + Glifosato 1440)	108.8 ± 1.2 C
(MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720	130.1 ± 12.8 C
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1%	151.2 ± 28.4 BC

^aMedias dentro de la misma columna seguida de la misma letra no son significativamente diferente al 5% de probabilidad determinada por la prueba de Tukey. Valores medios \pm error estándar de la media.

4.3.2. Año 2010 olivar

4.3.2.1. Evaluación visual

Bajo las condiciones descritas, el tratamiento que mostró la mejor eficacia en el control a 15 días después de la aplicación (DDA) fue Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%; más una segunda aplicación de Saflufenacil 20 + Dash 0.75%. Sin embargo, no existieron diferencias significativas con los tratamientos Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%; Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1% y Glifosato 2160 + Amitrol 1200, los cuales presentaron porcentajes de control aceptables. Los tratamientos herbicidas con los menores porcentajes de control fueron Glifosato 4320 y Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200.

Pasados 30 días DDA a excepción de los tratamientos Glifosato 2160 y Glifosato 4320, el resto de los tratamientos controlaron satisfactoriamente la cubierta vegetal de *Conyza* spp. El mejor tratamiento fue la mezcla Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% más una segunda aplicación de Saflufenacil 20 + Dash 0.75% (Tabla 4-6).

Tabla 4- 6. Evaluación visual de la eficacia en los distintos tratamientos herbicidas realizados sobre *Conyza* spp. en Ferreira, Portugal. Año 2010.

Tratamiento	^a Días después del tratamiento	
	15	30
Control	0.0 ± 0.0 G	0.0 ± 0.0 F
Glifosato 2160	63.33 ± 5.77 EF	46.67 ± 5.77 E
Glifosato 4320	53.33 ± 5.77 F	40.00 ± 0.00 E
Flazasulfuron 200	78.33 ± 2.89 CD	86.67 ± 5.77 CD
Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200	56.67 ± 5.77 F	85.00 ± 5.00 D
Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	80.00 ± 0.00 BCD	95.00 ± 0.00 ABC
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	93.33 ± 2.89 AB	96.67 ± 2.89 AB
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *	98.33 ± 2.89 A	100.00 ± 0.00 A
(MCPA 1440 + Glifosato 1440)	63.33 ± 11.55 EF	90.00 ± 0.00 BCD
(MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720	73.33 ± 2.89 DE	95.00 ± 0.00 ABC
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1%	90.00 ± 0.00 ABC	98.33 ± 2.89 AB
Glifosato 2160 + Amitrol 1200	93.33 ± 2.89 AB	93.33 ± 2.89 ABCD

^aMedias dentro de una misma columna seguida de la misma letra no son significativamente diferente al 5% de probabilidad determinada por la prueba de Tukey. Valores medios ± error estándar de la media.

Comparando los tratamientos realizados durante el año 2009 a 30 DDA en cítricos, con los realizados durante este año 2010, podemos observar que a excepción de los tratamientos a base de glifosato (2160 y 4320 g ia ha⁻¹) el resto de los tratamientos presentaron una mejor eficacia en el control de *Conyza* spp. incluso aquellos tratamientos que en el 2009 mostraron prácticamente una eficacia nula (Tabla 4-4; Tabla 4-6). Por ejemplo, el tratamiento Saflufenacil 20 + Dash 0.75% presentó un 20% de control a 30 DDA cuando se realizó el tratamiento en cítricos (2009); mientras que este mismo tratamiento presentó un 95% de control cuando fue utilizado en olivar (año 2010). Una posible explicación de esto, es la diferencia en las condiciones geográficas; una mayor humedad en el terreno, así como una mayor humedad relativa podría explicar una mejor absorción/translocación de los herbicidas y, por lo tanto, una mejor eficacia.

4.3.2.2. Evaluación cuantitativa

En la evaluación cuantitativa, algunos datos no estuvieron en concordancia con las evaluaciones visuales. Por ejemplo, el tratamiento a base de Flazasulfuron 200 presentó una menor cantidad de materia seca que el tratamiento a base de Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200 a pesar del hecho de que ambos tratamientos mostraron casi la misma eficacia en el control. Lo anterior puede ser debido a la distribución irregular de las plantas de *Conyza* spp. durante el ensayo en las diferentes unidades experimentales (Tabla 4-7).

Tabla 4- 7. Peso seco por m² de los diferentes tratamientos herbicidas llevados a cabo sobre *Conyza* spp. a 30 DDA en Ferreira, Portugal. Año 2010.

Tratamiento	^a Peso seco g m ²
Control	448.0 ± 14.1 A
Glifosato 2160	224.4 ± 20.4 BC
Glifosato 4320	274.4 ± 13.6 B
Flazasulfuron 200	70.8 ± 7.1 EF
Glifosato 2160 + Flazasulfuron 200	171.2 ± 26.6 CD
Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	33.0 ± 4.2 EFG
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%	52.6 ± 17.5 EFG
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *	30.1 ± 9.8 FG
(MCPA 1440 + Glifosato 1440)	153.2 ± 10.2 D
(MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720	88.6 ± 15.0 E
Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1%	34.9 ± 6.9 EFG
Glifosato 2160 + Amitrol 1200	11.7 ± 3.3 G

^aMedias dentro de la misma columna seguida de la misma letra no son significativamente diferente al 5% de probabilidad determinada por la prueba de Tukey. Valores medios ± error estándar de la media.

Estos ensayos han demostrado que *Conyza* spp. es aún controlada con mezclas de glifosato. Por ejemplo, en las condiciones dadas Saflufenacil 20 + Dash 0.75%; Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75%; Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% en doble aplicación; (MCPA 1440 + Glifosato 1440); (MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720; Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Aceite 1% y Glifosato 2160 + Amitrol 1200 controlaron efectivamente la cubierta vegetal de *Conyza* spp.

4.3.3. Año 2012 cítricos

4.3.3.1. Evaluación visual

Los resultados presentados corresponden a las épocas de aplicación A y B a 45 días después del estadio B (DDT-B). Los resultados en la Tabla 4-8 muestran que la mezcla de MCPA con glifosato en los tratamientos 15 y 16, obtuvo la mejor eficacia en el control a 45 DDT-B respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos 2 y 14 mostraron la menor eficacia en el control de *Conyza* spp. con 43.3 y 71.7% de control, respectivamente, los cuales fueron significativamente diferente al resto de los tratamientos. Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que el uso de las dosis altas de glifosato a 2160 g ia ha⁻¹ (Trat. 3) aplicado en postemergencia temprana presentó una buena eficacia en el control (91%) sobre *Conyza* spp., pero el control es mejorado con la adición de otros herbicidas de postemergencia como MCPA o amitrol. El uso de diquat, el cual tuvo una buena eficacia en el control en las condiciones descritas junto con un herbicida de preemergencia pueden ser una alternativa en los casos donde el control con glifosato no es posible debido al aumento de la resistencia.

Tabla 4- 8. Eficacia de los diferentes tratamientos aplicados sobre *Conyza* spp. resistente al herbicida glifosato en Palma del Río, Córdoba. Año 2012.

	Tratamiento	Época de aplicación	^aControl %^b
1	-Control no tratado	---	0.0 D
2	-Glifosato-sal de potasio	B	43.3 C
3	-Glifosato-sal de potasio	B	91.7 A
4	-Isoxaben	A	87.7 A
	-Glifosato-sal de potasio	B	
5	-Pendimetalina	A	85.7 A
	-Glifosato-sal de potasio	B	
6	-Flumioxazin	A	93.3 A
	-Glifosato-sal de potasio	B	
7	-Oxifluorfen	A	91.0 A
	-Glifosato-sal de potasio	B	
	-Amitrol	B	
8	-Tiocianato amónico	B	96.7 A
	-Glifosato-sal de potasio	B	
9	-Flazasulfuron	B	89.0 A
	-Glifosato-sal de potasio	B	
10	-Glifosato-sal de potasio	B	91.7 A
	-Glufosinato de amonio	C	
11	-Pendimetalina	A	96.3 A
	-Diquat	B	
	-Fluometuron	A	94.7 A
12	-Terbutilazina	A	
	-Glifosato-sal de potasio	B	
13	-Diflufenican	A	91.0 A
	-Glifosato-sal de potasio	B	
	-Sulfonilurea EXP.	B	71.7 B
14	-Surfactante	B	
	-Glifosato-sal de potasio	B	
15	-MCPA	B	98.0 A
	-Glifosato	B	

Continúa

	-MCPA	B	
16	-Glifosato	B	99.3 A
	-MCPA	C	
	-Glifosato	C	
17	-Glifosato-sal de potasio	B	84.3 A
	-Fluroxipir	C	
18	-Glifosato-sal de potasio	B	88.3 A
	-Clopiralida	C	

^a Evaluación realizada 45 días después de la aplicación del estadío B (DDT-B). ^b Medias dentro de la misma columna seguida de la misma letra no son significativamente diferente al 5% de probabilidad determinada por la prueba de Tukey.

A: Preemergencia hasta el estadío de dos hojas; B: estadío de roseta (9-10 hojas); C: elongación del tallo (< 25 cm).

4.3.3.2. Evaluación cuantitativa

Como se puede observar en la Tabla 4-9, la mayoría de los tratamientos tuvieron un peso seco inferior respecto al control no tratado, en la tabla solamente se muestran los tratamientos en los cuales se pudo obtener material vegetal para realizar la evaluación cuantitativa. Como era de esperar, el tratamiento a base de glifosato a una dosis de 720 g de ia ha⁻¹ (Trat. 2) tuvo la mayor cantidad de peso seco respecto al resto de tratamientos (este tratamiento presentó un % de control del 43.3). Sin embargo, a una dosis mayor como se muestra en el Trat. 3, el peso seco disminuyó y fue similar al resto de tratamientos, lo cual indica que la resistencia a este herbicida todavía no alcanza niveles altos. En estos tratamientos también se observó disparidades entre el % de control y la cantidad de peso seco obtenido al final de ensayo. El Trat. 6 tuvo un buen porcentaje de control, sin embargo la cantidad de peso seco obtenida fue superior respecto a tratamientos donde el control fue inferior y aún así se

obtuvieron bajas cantidades de materia seca (Trat. 9). Respecto al resto de tratamientos donde no se pudo obtener materia vegetal, esto puede ser debido en gran parte a que los tratamientos fueron ayudados por la falta de agua durante el periodo en el que se llevó a cabo este ensayo. Lo mismo ocurrió en ensayos con una cubierta de *Lolium rigidum* resistente a glifosato, donde las evaluaciones y posteriores tratamientos tuvieron que ser cancelados debido a la escasez de plantas (datos no mostrados).

Tabla 4- 9. Peso seco por m² de los diferentes tratamientos herbicidas llevados a cabo sobre *Conyza* spp. resistente al herbicida glifosato en Palma del Río, Córdoba. Año 2012.

	Tratamiento	Peso Seco (g m ²)
1	-Control no tratado	195±7
2	-Glifosato-sal de potasio	96.2±4.6
3	-Glifosato-sal de potasio	25.3±6.1
4	-Isoxaben	40.3±1.5
	-Glifosato-sal de potasio	
5	-Pendimetalina	50.0±3.2
	-Glifosato-sal de potasio	
6	-Flumioxazin	31.1±4.4
	-Glifosato-sal de potasio	
9	-Flazasulfuron	11.3±2.2
	-Glifosato-sal de potasio	
10	-Glifosato-sal de potasio	7.8±1.5
	-Glufosinato de amonio	
	-Fluometuron	
12	-Terbutilazina	10.43±1.9
	-Glifosato-sal de potasio	
13	-Diflufenican	31.5±6.0
	-Glifosato-sal de potasio	

4.4. DISCUSIÓN

Como se puede observar, aún quedan diferentes alternativas químicas para el control de *Conyza* spp. Ensayos de campo realizados sobre *C. bonariensis* resistente a glifosato en Grecia, ha mostrado entre un 70 y un 90% de control con la aplicación de glufosinato. Sin embargo, el control sobre esta especie aumentó ligeramente cuando glufosinato se mezcló con oxyfluorfen (Travlos y Chachalis, 2010). Los mismos autores reportan que el uso de diquat puede ser una herramienta útil en el control de *C. bonariensis* resistente a glifosato. En nuestros ensayos, los resultados encontrados con la aplicación de diquat fueron similares. Por el contrario, el uso del herbicida triasulfuron no controló eficazmente tanto al biotipo sensible como al resistente de esta mala hierba (Travlos y Chachalis, 2010).

Ensayos de campo realizados sobre *C. bonariensis* resistente a glifosato en el sur de España, mostraron que el herbicida glufosinato además de las mezclas sulfosato + flazasulfuron y sulfosato + fluroxipir tuvieron excelentes porcentajes de control; estos herbicidas pueden ser útiles para el manejo de esta mala hierba (Urbano *et al.*, 2007).

Ensayos realizados sobre *C. canadensis* resistente a glifosato en tres estadíos diferentes de crecimiento, han mostrado que los mejores porcentajes de control se obtuvieron en el estadio de plántula o roseta pequeña que en estadíos avanzados de crecimiento, ya sea una roseta grande o durante la emergencia del tallo (VanGessel *et al.*, 2009). En nuestros ensayos, para el año 2011-2012, este criterio no fue posible determinarlo ya que realmente no se realizó ningún ensayo en este estadio de crecimiento en particular.

En otros ensayos realizados sobre *C. canadensis* resistente a glifosato mediante el uso de herbicidas “quemantes” y el propio glifosato, se ha encontrado que incrementando la dosis normal de glifosato aumenta el porcentaje de control, dosis de 1.25 kg ha⁻¹ resultaron en aproximadamente un 74% de control; glifosato aplicado en mezcla con 2,4-D o dicamba mostró un control eficiente de *C. canadensis* ($\geq 90\%$) (Eubank *et al.*, 2008). El uso de paraquat sin embargo, no mostró un control satisfactorio aún incrementando la dosis de 0.84 a 0.98 kg ha⁻¹. Por el contrario, la mezcla de paraquat con 2,4-D o dicamba resultó en un elevado porcentaje de control durante dos años de ensayo (78 a 89%). El uso de glufosinato sólo ha mostrado una gran efectividad en el control de *C. canadensis* resistente al herbicida glifosato (Eubank *et al.*, 2008).

Estudios realizados en algodón, mediante aplicaciones de herbicidas preemergentes y “quemantes” antes de la siembra para controlar *C. canadensis* resistente a glifosato, han mostrado que los herbicidas fluometuron, oxyfluorfen y norflurazon mostraron hasta un 80% de control a 8 semanas después del tratamiento. Glufosinato aplicado antes de la siembra del algodón (8-10 semanas), no mostró una buena eficacia en el control de *C. canadensis* ya que las plantas rebrotaron y existieron nuevas emergencias. Utilizando la mezcla dicamba-glufosinato ha mostrado un mejor control de *C. canadensis* a la vez que provee una cierta residualidad sobre las nuevas emergencias. Se ha evitado nuevas emergencias de *C. canadensis* dentro de las 10-12 semanas posteriores a la utilización de la mezcla glufosinato-dicamba-flumioxazin (Norsworthy *et al.*, 2009). En nuestros resultados, a excepción del uso de glufosinato, se obtuvieron resultados similares mediante la utilización de herbicidas

preemergentes como son flumioxazin, fluometuron y oxifluorfen en el control de *C. canadensis* resistente al herbicida glifosato.

En general, de todos los resultados obtenidos podemos mencionar que el manejo químico de *C. canadensis* resistente a glifosato debe incluir la utilización de otras moléculas y modos de acción a fin de evitar selecciones más fuertes y preservar por más tiempo herbicidas tan importantes como lo es el glifosato. El uso de herbicidas en preemergencia ha mostrado ser una herramienta eficaz para controlar *C. canadensis*.

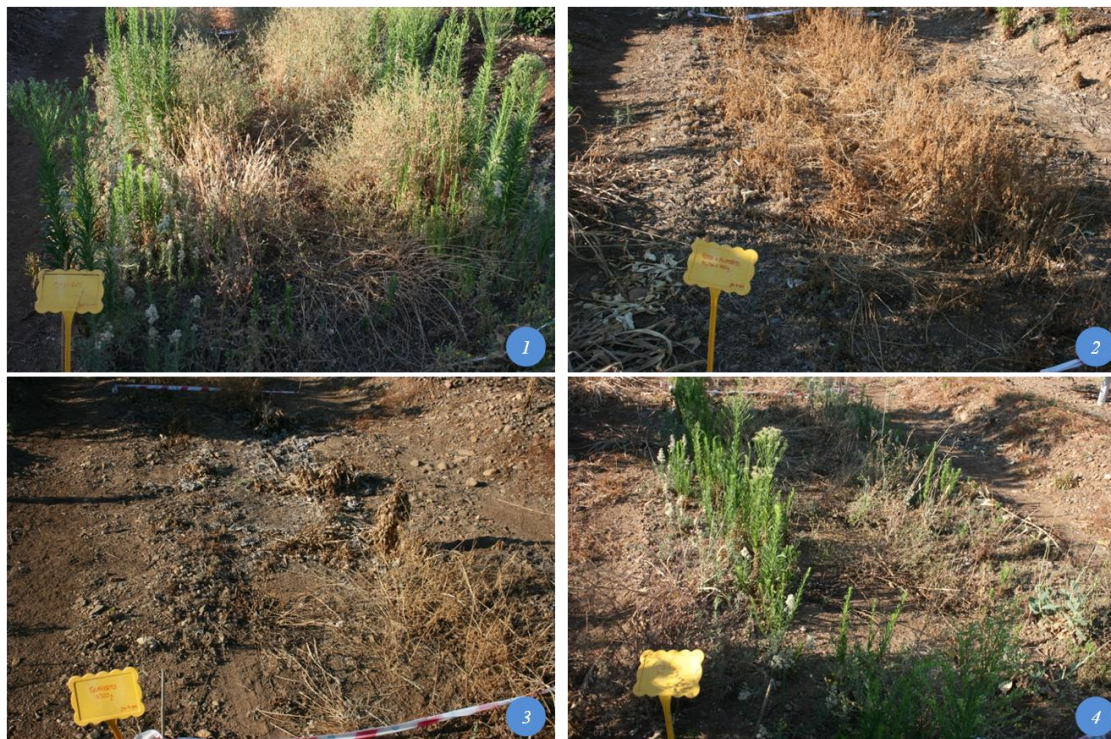
4.5. REFERENCIAS

- Bastida, F., Muriel, A.J. & Menendez, J. (2005). La flora arvense de los cítricos en la Provincia de Huelva. In *Malherbología Ibérica y Magrebí: soluciones comunes a problemas comunes*, 305-315 (Eds J. Menendez, F. Bastida, C. Fernández-Quintanilla, J.L. González, J. Recasens, M. Royuela, A. Verdú and C. Zaragoza). Huelva, España: Universidad de Huelva.
- Carretero, J.L. (2004). *Flora arvense española. Las malas hierbas de los cultivos españoles*. Valencia, España: Phytoma.
- Eubank, T.W., Poston, D.H., Nandula, V.K., Koger, C.H., Shaw, D.R. & Reynolds, D.B. (2008). Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) control using glyphosate-, paraquat-, and glufosinate-based herbicide programs. *Weed Technology* 22: 16-21.
- González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H.E., Mülleder, N., Domínguez-Valenzuela, J.A. & De Prado, R. (2009). Resistance of *Conyza canadensis* to glyphosate in Spain. *XIIIth International Conference on Weed Biology*: 381-386.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J. & Herberger, J. (Eds) (1997). *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. Wiley.
- Holt, J.S., Powles, S.B. & Holtum, J.A.M. (1993). Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 203-229.
- Norsworthy, J.K., McClelland, M. & Griffith, G.M. (2009). *Conyza canadensis* (L.) Cronquist response to pre-plant application of residual herbicides in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Crop Protection* 28: 62-67.

- Recasens, J. & Conesa, J.A. (2009). *Malas hierbas en plántula: guía de identificación*. Lleida, España: Edicions de la Universitat de Lleida.
- Saavedra, M.M. & Pastor, M. (Eds) (2002). *Sistemas de cultivo en olivar (manejo de malas hierbas y herbicidas)*. Madrid, España: Agrícola Española.
- Steinruecken, H.C. & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
- Travlos, I.S. & Chachalis, D. (2010). Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) is reported in Greece. *Weed Technology* 24: 569-573.
- Urbano, J.M., Borrego, A., Torres, V., Leon, J.M., Jimenez, C., Dinelli, G. & Barnes, J. (2007). Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technology* 21: 396-401.
- VanGessel, M.J., Scott, B.A., Johnson, Q.R. & White-Hansen, S.E. (2009). Influence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) growth stage on response to glyphosate applications. *Weed Technology* 23: 49-53.

ANEXO I

**FOTOGRAFÍAS REPRESENTATIVAS DE
LOS ENSAYOS DE CAMPO**



Año 2009 Cítricos

60 DDT. 1- Control; 2- (MCPA 1440 + Glifosato 1440) + Glifosato 720; 3- Glifosato 4320; 4- Saflufenacil 20 + Dash 0.75%



Año 2010 Olivar

30 DDT. 1- Control; 2- Glifosato 2160 + Saflufenacil 20 + Dash 0.75% *; 3- Glifosato 4320



Año 2012 Cítricos

45 DDT. 1- Control; 2- (MCPA + Glifosato) aplicado en los estadíos B y C (Trat. 16); 3- Glifosato 720 (Trat. 2).

ANEXO II

PUBLICACIONES

Differential Susceptibility to Glyphosate among the *Conyza* Weed Species in Spain

González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H., Bastida, F., Mülleder, N., Smeda, R.J. & De Prado, R. (2010). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4361-4366.

Differential Susceptibility to Glyphosate among the *Conyza* Weed Species in SpainFIDEL GONZÁLEZ-TORRALVA,[†] HUGO CRUZ-HIPOLITO,[‡] FERNANDO BASTIDA,[‡]
NORBERT MÜLLEDER,[§] REID J. SMEDA,^{||} AND RAFAEL DE PRADO*,[†][†]Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain,[‡]Department of Agroforestry Sciences, University of Huelva, 21819 Huelva, Spain,[§]Monsanto International SARL, 1110 Switzerland, and ^{||}Department of Agronomy,
University of Missouri, Columbia, Missouri 65211

Greenhouse and laboratory experiments were conducted to investigate differences in glyphosate susceptibility among three species of the genus *Conyza* introduced as weeds in Spain: tall fleabane (*Conyza sumatrensis*), hairy fleabane (*Conyza bonariensis*), and horseweed (*Conyza canadensis*). Plant material was obtained from seeds collected in weed populations growing in olive groves and citrus orchards in southern Spain, with no previous history of glyphosate application. Dose–response curves displayed ED₅₀ values of 2.9, 15.7, and 34.9 g ai ha^{−1}, respectively, for *C. sumatrensis*, *C. bonariensis*, and *C. canadensis* plants at the rosette stage (6–8 leaves). Significant differences were found among the three species in the glyphosate retention on leaves as well as the leaf contact angle. The species order according to glyphosate retention was *C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*, while the mean contact angles of glyphosate droplets were 59.2, 65.5, and 72.9°, respectively. There were no significant differences among species in the absorption of [¹⁴C]glyphosate (ranged from 37.4% for *C. canadensis* to 52.4% for *C. sumatrensis*), but the order among species was the same as glyphosate retention. The amount of radioactivity translocated from treated leaves was lower in *C. canadensis* as compared to the other two species (*C. sumatrensis* > *C. bonariensis* > *C. canadensis*). Combined, all of the studied parameters identified differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* species. Each species accumulated shikimate in leaf tissues following application of glyphosate at 200 g ai ha^{−1}. However, *C. canadensis* exhibited lower shikimate levels than the other two species at 168 h after herbicide application. For hairy fleabane, a greenhouse study explored its susceptibility to glyphosate at three developmental stages: rosette, bolting (stem height, 10–15 cm), and flowering. The ED₅₀ was lower at the rosette stage (15.7 g ai ha^{−1}) as compared to bolting (86.6 g ai ha^{−1}), with the highest ED₅₀ values occurring at flowering (117.5 g ai ha^{−1}); plants at the earlier developmental stage retained more glyphosate. These results agree with field observations that plants at early developmental stages are more sensitive to glyphosate.

KEYWORDS: *Conyza* spp.; glyphosate; susceptibility; laboratory and field assays

INTRODUCTION

Different species of the genus *Conyza* Less. (Asteraceae) are found in Europe as neophytes introduced from both North and South America. These invasive species, now considered to be among the most common plant species in the recipient territory (1), behave primarily as ruderal plants, inhabiting road margins, recently abandoned fields, riverbanks, urban wasteland, etc. *Conyza* spp. occur as weeds in more than 40 crops in 70 countries (2). Recently, *Conyza* spp. have increased in severity in fruit orchards and olive groves in southern Spain (3). Prior to conservation tillage practices in orchard (mainly citrus and olive trees) production, *Conyza* spp. were easily controlled with tillage (4). Even with the suppression of primary tillage, glyphosate application in early spring was an effective tool for *Conyza*

control. However, in a recent survey of consultants in southern Spain, *Conyza* spp., along with *Lolium* spp., were considered to be the most important weeds in fruit orchards despite extensive herbicide use (5). Several underlying factors could explain this, including application of glyphosate at later stages of weed development, which are more tolerant, differential susceptibility among *Conyza* species and the selection of biotypes that exhibit herbicide resistance (6, 7). In Spain, three annual *Conyza* species are widespread in citrus orchards and olive groves: hairy fleabane [*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.], horseweed [*Conyza canadensis* (L.) Cronq.], and tall fleabane [*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker]. For all three species, seedling emergence is preferably in winter (8). Individual plants of *Conyza* spp. are prolific; *C. canadensis* can produce 50000–200000 seeds per

plant (2). Seeds are dispersed by the wind; distances up to 500 m have been measured for *C. canadensis* (9). The ability to disperse seeds a long distance suggests that effective management strategies of *Conyza* spp. should be practiced on larger spatial scales than the individual field (9). In addition, seed longevity in the soil has been documented up to 3 years in *Conyza* spp. in some crops (10). All of the above biological traits contribute to difficulty for the long-term management of *Conyza* spp. (10). For these reasons, preplant control is needed in orchards where conservation tillage is practiced. As an alternative, cover crops are being used to prevent or reduce intensive herbicide use in agriculture (11). However, dependence upon herbicides for controlling weeds persists, mostly due to their high efficacy for controlling the broad spectrum of weeds associated with each particular crop (10, 12, 13).

The herbicide glyphosate has been used extensively in agriculture worldwide for about 30 years, and today, it is the most commercialized herbicide in the world (14). Glyphosate belongs to the chemical group of amino acid synthesis inhibitors, and *N*-(phosphonomethyl) glycine is the chemical name (15). Following absorption, it is readily translocated with photosynthates from the leaves to meristematic tissue (16). In sensitive plants, glyphosate inhibits the enzyme 5-enolpyruvylshikimate phosphate synthase (EPSPS) (EC 2.5.1.19) (17). EPSPS is the critical and essential enzyme catalyzing the conversion of shikimate 3-phosphate and phosphoenolpyruvate to EPSPS (18, 19). The shikimic acid pathway plays a fundamental role in the biosynthesis of the aromatic essential amino acids phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, as well as other important secondary compounds, such as auxins and allelochemicals (20).

In southern Spain, glyphosate has been recommended for *Conyza* spp. control in olive groves and citrus crops for many years. The objectives of this research were to (1) determine in greenhouse conditions the efficacy of glyphosate on *C. sumatrensis*, *C. bonariensis*, and *C. canadensis*; (2) characterize physical (foliar retention and contact angle) and physiological (shikimic acid accumulation, absorption and translocation of [14 C]glyphosate) factors that could explain differential sensitivity to glyphosate in *C. sumatrensis*, *C. bonariensis*, and *C. canadensis*; and (3) evaluate glyphosate efficacy in field conditions with *C. bonariensis* and *C. canadensis* at three growth stages.

MATERIALS AND METHODS

Herbicides. [14 C]Glyphosate (specific activity, 273.8 MBq mmol $^{-1}$; 95% radiochemical purity) was provided by Sigma Aldrich (France). A commercial formulation (Roundup Energy 45% w/v SL) of this herbicide was supplied by Monsanto Agricultura España S. L. and used for all in vivo and in vitro assays.

Plant Material and Growing Conditions. Glyphosate-susceptible populations of *C. sumatrensis*, *C. bonariensis*, and *C. canadensis* were used in the experiments described below. Seeds were collected in 2006 from orchards in Southern Spain. *C. bonariensis* and *C. canadensis* were collected from olive orchards in Córdoba, while *C. sumatrensis* was collected from citrus orchards in Huelva. In none of the cases had glyphosate ever been applied to control these weeds. The seeds were sown in 663 cm 3 pots filled with peat and were covered with transparent film until the seeds germinated. Seedlings were planted in pots (one plant per pot) containing a peat-sandy loam potting mixture (1:1 v/v) in a growth chamber at 28/18 °C (day/night), 16 h photoperiod, 850 μ mol m $^{-2}$ s $^{-1}$ photosynthetic photon flux density, and 80% relative humidity.

Dose Response. Glyphosate was applied to plants at the rosette stage, that is, growth stage 14–15 according to the BBCH phenological scale (21), using a laboratory spray chamber at a height of 50 cm above the plants. Herbicide solutions were applied with flat fan nozzles (Tee Jet 8002 EVS) at 200 kPa and an output volume equivalent to 200 L ha $^{-1}$. Applied were the following doses: 0, 25, 50, 75, 100, 150, and 200 g ai ha $^{-1}$. In addition,

for *C. bonariensis*, a species with more rapid vegetative growth as compared to the other two species, glyphosate was applied at two additional developmental stages: bolting (stems 10–15 cm in height; BBCH 32) and flowering (BBCH 55). The experiment was arranged in a completely randomized design with five replications per treatment (each replication with three plants). At 21 days after treatment, plants were cut at ground level, and the fresh weight was recorded and expressed as a percentage of untreated control plants. The same procedure was performed in the two additional growth stages of *C. bonariensis*. Herbicide rates inhibiting plant growth by 50% (ED $_{50}$) were determined for each species according to ref 22. Data were pooled and fitted to a nonlinear, log–logistic regression model:

$$Y = c + \{(d - c) / [1 + (x/g)^b]\}$$

where Y is the fresh above-ground weight expressed as a percentage of the untreated control, c and d are coefficients corresponding to the lower and upper asymptotes, b is the slope of the line, g is the herbicide rate at the point of inflection halfway between the upper and the lower asymptotes and represents the ED $_{50}$, and x (independent variable) is the herbicide dose. Regression analysis was conducted using Sigma Plot 8.0 statistical software (23).

Foliar Retention. The methodology described by ref 24 was followed. Plants of each *Conyza* species at the rosette stage (BBCH 14–15) were sprayed with a colored glyphosate solution using the spray chamber as described above. In addition, the same treatment was applied to plants of *C. bonariensis* at the bolting (BBCH 32) and flowering (BBCH 55) stage. Treatment solutions contained glyphosate at 200 g ai ha $^{-1}$ in a volume of 200 L and 100 mg L $^{-1}$ Na-fluorescein. After the solution had dried on the foliage, plants were cut off at ground level and immersed for 30 s in 50 mL of 5 mM NaOH. Readings were made with a spectrofluorimeter at 490/510 nm. Plants were then placed at 80 °C for 72 h, and the dry matter was recorded. Four replications were used for each treatment (three plants per replication), and the experiment was repeated over time.

Contact Angle. The third leaf of each *Conyza* species at the rosette stage was cut off and placed onto a horizontal surface. Each leaf was treated with one, 1 μ L droplet containing glyphosate corresponding to 200 g ai ha $^{-1}$ in a volume of 200 L. Droplets were applied in the center of the adaxial surface. The pattern of droplet deposition was observed in a horizontal microscope (Leica MZ6 1.8X-4X). Images were captured with a camera [Leica Digilux 4.3 (1.2–8–4.5/8.3–24.9 mm)] + Supermacro Leica Digimacro 4.3] adapted to one of the oculars of the microscope. The droplets were applied every 18 s. The contact angle was obtained by digital image analysis using the ImageJ program (25). Thirty replicates were measured for each *Conyza* spp.

Shikimic Acid Accumulation. Plants from each *Conyza* spp. at the rosette stage were treated with glyphosate (200 g ai ha $^{-1}$) applied in a volume of 200 L using a laboratory spray chamber as described above. Fifty milligrams of treated and nontreated plant tissue was harvested simultaneously and frozen in liquid nitrogen at 24, 48, 72, 96, and 168 h after treatment, using the methodology described by ref 26. Shikimic acid accumulation was optically determined using a Beckman DU-640 spectrophotometer at 380 nm, and results were expressed in μ g per g fresh weight. The experiment consisted of eight treated and three nontreated plants per species with three replicates.

Absorption and Translocation of [14 C]Glyphosate. [14 C]Glyphosate was mixed with commercially formulated glyphosate to prepare a solution with a specific activity of 0.417 kBq μ L $^{-1}$ (both absorption and translocation experiments) and a glyphosate concentration of 1 g ai L $^{-1}$ (200 g ai ha $^{-1}$ in 200 L). The radiolabeled herbicide was applied in two droplets of 0.5 μ L on the adaxial surface of the third leaf in each plant using a micropipet (LabMate + HTL). A total of 0.834 kBq was applied per plant. Preliminary assays showed that 96 h after herbicide treatment is the most suitable time for harvest to determine maximum glyphosate absorption and translocation and early visible symptoms of glyphosate effects. Therefore, treated plants were carefully removed from potting mix 96 h after herbicide treatment. The treated leaf was excised, and the unabsorbed [14 C]glyphosate was removed with 3 mL of a water–acetone (1:1 v/v) solution. Plants were separated into treated leaf, rest of the shoot, and root. The rinsate was mixed with 7 mL of scintillation liquid and analyzed by liquid scintillation spectrometry (LSS) (Scintillation Counter, Beckman

Table 1. Parameters of the Model^a Used To Calculate the Glyphosate Dose Required for 50% Plant Injury (ED₅₀) of *Conyza* spp. Plants at Rosette Stage (BBCH 14–15)

	c	d	b	ED ₅₀ (g ai ha ⁻¹)	pseudo <i>r</i> ² ^b	<i>P</i> ^c
<i>C. sumatrensis</i>	0.93	99.99	0.74	2.9 ± 3.1	0.98	<0.0001
<i>C. bonariensis</i>	0.84	99.99	2.09	15.7 ± 0.8	0.99	<0.0001
<i>C. canadensis</i>	1.14	100.20	5.20	34.9 ± 1.6	0.97	<0.0001

^a $Y = c + \{(d - c)/[1 + (x/g)^b]\}$ where *Y* is the fresh weight (% of untreated control), *x* (independent variable) is the herbicide dose, *c* and *d* are the lower and the upper asymptotes, *b* is the slope of the line, and *g* (ED₅₀) is the effective dose required for 50% plant injury. Data were pooled and fitted to a nonlinear regression model. ^b Approximate coefficient of determination of nonlinear models with a defined intercept calculated as pseudo *r*² = 1 – (sums of squares of the regression/corrected total sums of squares). ^c Probability level of significance of the nonlinear model. ED₅₀ mean values ± standard errors of the mean.

LS 6500). The plant tissue was dried at 60 °C over 72 h and combusted in a biological sample oxidizer, Packard Tri Carb 307. The ¹⁴CO₂ evolved was trapped and counted in 18 mL of a mixture of Carbo-Sorb E and Permafluor (9:9 v/v) (Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV).

Radioactivity was quantified by LSS, and the percentage of herbicide absorbed was expressed as kBq in combusted tissue divided by kBq in combusted tissue + kBq in leaf washes and multiplied by 100. The experiment consisted of five replicates.

Phosphor Imaging. Visualization of herbicide translocation was performed using a phosphor imager (Cyclone, Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV). Plants were treated with respective unlabeled and radiolabeled glyphosate as described for absorption and translocation experiments. Whole plants were gently rinsed, blotted dry, then pressed, and oven-dried (50 °C, 4 days); pressed plants were placed adjacent to 25 cm × 12.5 cm phosphor storage film during 6 h and scanned for radiolabel dispersion.

Field Experiments. In an olive grove near Cordoba in southern Spain ("Sotillo Bajo" farm), field experiments were carried out at three growth stages of *Conyza* plants: rosette (BBCH 14–15), bolting (BBCH 32), and flowering (BBCH 55). The olive grove was under super intensive management, with trees spaced 2 m between rows and 1.5 m apart within the row. At the time of herbicide application, the relative distribution of *C. canadensis* and *C. bonariensis* plants was 75 and 25%, respectively, while *C. sumatrensis* was absent. The experiment was conducted using a completely randomized design with three replications. The treated area for each treatment was 2 m wide by 5 m long. Treatments included an untreated control and glyphosate at 5 L ha⁻¹ (2250 g ai ha⁻¹) (Roundup Energy 45% w/v SL) + Orosorb 0.8% (Alcohol etoxilate 8.92% w/v SL). The herbicide was applied at 2.3 km/h with a pneumatic backpack sprayer equipped with four flat fan nozzles (Albus API 11002) at 200 kPa and a height of 50 cm; the output volume was equivalent to 200 L ha⁻¹.

The herbicide effect was measured quantitatively on all treatments 90 days after application at the rosette stage (BBCH 14–15). At random, a 0.25 m² square was thrown down in each plot, and all of the plant material was cut off at ground level and placed into a paper bag (24.8 cm × 35.3 cm). Plant material was dried at 80 °C for 96 h, and the dry weight of each sample was recorded. Results were expressed in g of dry weight per m².

Statistical Analyses. Data were subjected to analysis of variance. Means were compared using Tukey's honestly significant difference (HSD) test at the 5% probability level. Statistical analyses were done using Statistix v 8.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Dose Response. In greenhouse conditions, the three species of *Conyza* exhibited a high sensitivity to glyphosate at the rosette stage. However, differences were apparent among species. *C. sumatrensis* had an ED₅₀ of 2.9, followed by *C. bonariensis* with an ED₅₀ of 15.7 and *C. canadensis* with an ED₅₀ of 34.9 g ai ha⁻¹. These results show that *C. bonariensis* and *C. canadensis* are 5.4 and 12 times more tolerant, respectively, to glyphosate than *C. sumatrensis* (Table 1).

Table 2. Parameters of the Equation^a Used To Calculate the Glyphosate Dose Required for 50% Plant Injury (ED₅₀) of *C. bonariensis* at Three Different Growth Stages

growth stage	c	d	b	ED ₅₀ (g ai ha ⁻¹)	pseudo <i>r</i> ² ^b	<i>P</i> ^c
rosette (BBCH 14–15)	0.84	99.99	2.09	15.7 ± 0.8	0.99	<0.0001
bolting (BBCH 32)	4.39	95.15	1.96	86.6 ± 24.8	0.98	<0.0001
flowering (BBCH 55)	9.67	95.25	2.41	117.5 ± 31.5	0.84	<0.0001

^a Equation $Y = c + \{(d - c)/[1 + (x/g)^b]\}$, where *Y* is the fresh weight (% of untreated control), *x* (independent variable) is the herbicide dose, *c* and *d* are the lower and the upper asymptotes, *b* is the slope of the line, and *g* (ED₅₀) is the effective dose required for 50% plant injury. Data were pooled and fitted to a nonlinear regression model. ^b Approximate coefficient of determination of nonlinear models with a defined intercept calculated as pseudo *r*² = 1 – (sums of squares of the regression/corrected total sums of squares). ^c Probability level of significance of the nonlinear model. ED₅₀ mean values ± standard errors of the mean.

Table 3. Spray Retention and Contact Angle of Glyphosate Solution for Three *Conyza* spp. Treated in the Rosette Stage

	μL spraying solution g ⁻¹ dry matter ^a	contact angle (deg) ^a
<i>C. sumatrensis</i>	779 ± 110 a	59.2 ± 1.1 c
<i>C. bonariensis</i>	599 ± 50 b	65.4 ± 0.9 b
<i>C. canadensis</i>	484 ± 80 c	72.9 ± 2.0 a

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey test. Mean values ± standard errors of the mean.

Infestations of *Conyza* spp. have become widespread in southern Spain. These species are problematic in no-tillage production systems, which rely extensively on glyphosate for weed control. Under field conditions, *Conyza* spp. are treated commonly at various stages of growth. Growth-dependent susceptibility to glyphosate could be a primary factor limiting treatment efficacy. In fact, our results indicate that, for *C. bonariensis*, the ED₅₀ value increased by 7.5-fold for plants treated at the rosette stage versus flowering (Table 2). The determination if reduced response to glyphosate was due to spray coverage or physiological changes in plant growth were not possible. Research by refs 27 and 28 reported that horseweed was consistently more sensitive to glyphosate in the rosette stage as compared to later developmental stages.

Foliar Retention and Contact Angle. The relationship of glyphosate retention and leaf contact angle was inverse when comparing the three species. *Conyza* spp. leaves retained a large amount of glyphosate solution, in the range of 500–800 μL glyphosate g⁻¹ dry matter. However, spray retention of 1 g ai L⁻¹ glyphosate aqueous solution was significantly greater for *C. sumatrensis* as compared to the other species (Table 3). In contrast, contact angles of droplets containing commercial glyphosate were significantly lower for *C. sumatrensis* than for the other species, in the range of 65–75° (Table 3). Research by ref 25 carried out on *Ambrosia artemisiifolia* shoots demonstrated that retention of glyphosate approached 800 μL g⁻¹ dry matter, while contact angles of droplets containing commercial glyphosate were intermediate, in the 70–75° range. In comparison, retention values in difficult-to-wet species such as winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) were lower than 50 μL g⁻¹ (29).

Foliar retention was dependent upon the growth stage of the plants. Assays carried out on *C. bonariensis* showed that the spray retention rate of 1 g ai L⁻¹ glyphosate aqueous solution was significantly higher (*P* = 0.05) at bolting (BBCH 32): 227 ± 20 μL g⁻¹ as compared to the flowering (BBCH 55) with 184 ± 15 μL g⁻¹.

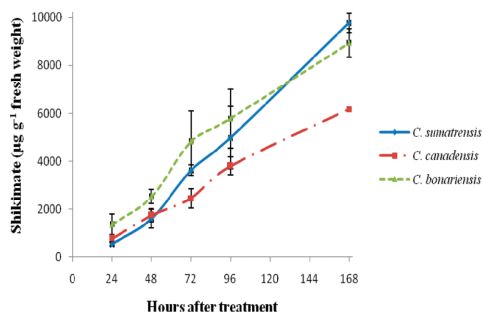


Figure 1. Shikimate accumulation of susceptible *Conyza* spp. plants following the application of glyphosate at 200 g ai ha⁻¹. Vertical bars represent \pm standard errors of the mean.

Table 4. Absorption and Translocation of [¹⁴C]Glyphosate in *Conyza* spp. at 96 h after Treatment

	% absorption ^a	translocation (% of absorbed) ^a		
		treated leaf	rest of plant	root
<i>C. sumatrensis</i>	52.4 \pm 3.8 a	82.4 \pm 1.6 b	5.9 \pm 1.2 a	11.6 \pm 1.5 a
<i>C. bonariensis</i>	48.8 \pm 5.5 a	85.2 \pm 0.6 b	6.4 \pm 0.6 a	8.3 \pm 0.1 a
<i>C. canadensis</i>	37.4 \pm 9.0 a	93.0 \pm 3.5 a	4.0 \pm 2.8 b	2.8 \pm 0.3 b

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey test. Mean values \pm standard errors of the mean.

Spray retention and contact angle are important parameters of herbicide efficacy, because they determine the maximum amount of herbicide that can penetrate the target plant. In some cases, differences in spray retention and contact angle are thought to play a role in herbicide efficacy and selectivity (30–32).

Shikimic Acid Accumulation. Changes in shikimate levels in plants are specifically the result of inhibiting EPSPS (33), and have been used as a marker for EPSPS sensitivity in plants to glyphosate (34). Comparatively, a species with a lower accumulation of shikimate likely requires a higher level of glyphosate to be lethal (higher ED₅₀). Shikimate concentrations in the absence of glyphosate application were low and tended to be less than 1500 μ g g⁻¹ fresh weight. Following application, final shikimate concentrations ranged from 6000 to 10000 μ g g⁻¹ fresh weight under laboratory conditions (Figure 1). Shikimate concentrations increased in all *Conyza* spp. leaf tissues after glyphosate application, with amounts similar between *C. sumatrensis* and *C. bonariensis*. Nevertheless, at time points greater than 96 h, *C. canadensis* accumulated less shikimate than the other two species, which is consistent with the higher ED₅₀ for *C. canadensis* (Table 1); differences with respect to the other two species were significant ($P = 0.05$). Shikimate concentrations were in agreement with results for the foliar retention and contact angle experiments for the three *Conyza* species.

Absorption and Translocation of [¹⁴C]Glyphosate. There were no significant differences in leaf absorption of applied [¹⁴C]-glyphosate among the *Conyza* spp. (Table 4); the herbicide penetration was greater in *C. sumatrensis* than in *C. bonariensis* and *C. canadensis*. Clearly, these results, together with those found for herbicide retention, could explain the differential susceptibility among the three *Conyza* species. In addition, there was a clear difference among plant species in the amount of glyphosate translocated from the treated leaf to untreated leaves (rest of plant) and the root. Translocation of glyphosate from the

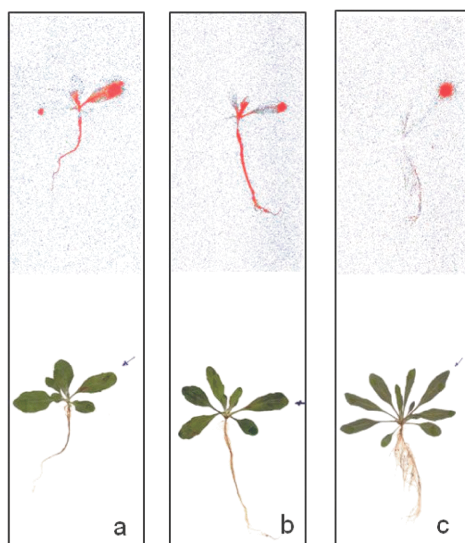


Figure 2. Phosphor images demonstrating movement of [¹⁴C]glyphosate in representative *C. sumatrensis* (a), *C. bonariensis* (b), and *C. canadensis* (c) plants. Images were recorded 96 h after treatment; the intensity of red coloration indicates greater concentrations of glyphosate. The arrows point toward the initially treated leaf.

treated leaf to roots was significantly different among *C. canadensis* (2.8%), *C. bonariensis* (8.3%), and *C. sumatrensis* (11.6%) (Table 4).

Phosphor Imaging. Differences in translocation of [¹⁴C]glyphosate among the *Conyza* spp. plants were also visualized by phosphor imaging (Figure 2). In general, 96 h after herbicide application, translocation of glyphosate from the treated leaf was faster, and accumulation was greater in young leaves (leaf crown) as compared to old leaves in all *Conyza* spp. Translocation to roots was clearly different, with less glyphosate accumulation in *C. canadensis* (Figure 2c) as compared to *C. bonariensis* (Figure 2b) and *C. sumatrensis* (Figure 2a). In this experiment, glyphosate damage (leaf chlorosis) was evident 96 h after glyphosate treatment in the leaf crown of *C. sumatrensis* and *C. bonariensis*, while only the tissue at the point of glyphosate application in *C. canadensis* plants was chlorotic. This visual difference was consistent with the differences observed in glyphosate retention, absorption and translocation, as well as shikimate accumulation.

Field Experiments. All of the *Conyza* plants in this field study were susceptible to commercial doses of glyphosate (Roundup Energy 45% w/v SL). However, different levels of control were found depending upon the application time (Table 5). Biomass reductions of the mixed stand of *Conyza* spp. exceeded 85% for applications at the rosette and bolting stage as compared to untreated plants, but reductions were only 45.8% for plants treated during flowering (Table 5). It is understood that *C. canadensis* may not have responded similarly to glyphosate as *C. bonariensis*, but a visual inspection of the field site indicated that the distribution of each species was rather uniform. Differential sensitivity between *C. canadensis* and *C. bonariensis* may explain why the dominant species in this field site was *C. canadensis*.

Table 5. Dry Weight of above Ground Biomass of *C. bonariensis* and *C. canadensis* at Different Growth Stages in an Olive Orchard in Córdoba, Spain^a

growth stage	dry weight (g m ⁻²) ^b	% reduction with respect to untreated plants ^c
rosette	23.8 ± 6.8	96.6
bolting	95.7 ± 16.9	86.5
flowering	385.7 ± 67.1	45.8

^aTreatment: glyphosate 5 L ha⁻¹ (2250 g ai ha⁻¹) + Orosorb 0.8%. ^bThe herbicide effect was measured quantitatively at 90 days after treatment of the rosette stage (BBCH 14–15) plants. ^cUntreated plants: 711.9 (± 151.4) g dry weight m².

Results demonstrate that the three species of *Conyza* in southern Spain naturally differ in response to glyphosate. Although field trials determined that each species could be controlled with labeled application rates, large differences in response to glyphosate were observed among the species. Dose–response assays confirmed that *C. sumatrensis* and *C. bonariensis* are more susceptible to glyphosate than *C. canadensis*, with the ED₅₀ *C. canadensis*/ED₅₀ *C. sumatrensis* in BBCH 14–15 stage greater than 10-fold. This can be explained by the poor herbicide retention of this species (1.6 lesser than *C. sumatrensis*), as well as reduced leaf contact angle.

Once glyphosate reaches the leaf surface, physiological factors contributed to reduced movement of glyphosate to the target site. It was determined that 96 h after treatment, *C. canadensis* absorbed up to 15% less glyphosate and translocated up to 11% less glyphosate as compared with the other two *Conyza* species. A reduction in the amount of glyphosate available at the target site in different plant parts for *C. canadensis* versus the other *Conyza* spp. also likely contributed to reduced sensitivity of *C. canadensis*. This resulted in less glyphosate reaching the target site; *C. canadensis* exhibited shikimate levels up to 40% lower than *C. sumatrensis* at 168 h after treatment.

Within each species, sensitivity to glyphosate was reduced as plants matured from the rosette to early bolting to the flowering stage. Optimum management of *Conyza* spp. should include labeled application rates at the proper timing (rosette stage). Although growers may prefer to increase rates as the treated size of plants increases, this strategy may lead to greater selection pressure for resistance. As the use of glyphosate continues in olive groves in Spain, it is expected that a shift in species will occur, favoring *C. canadensis*. In the field trial where glyphosate was applied, the distribution of *Conyza* spp. already favors *C. canadensis*.

LITERATURE CITED

- Thébaud, C.; Abbott, R. J. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: Quantitative trait and isozyme analysis. *Am. J. Bot.* **1995**, *82*, 360–368.
- Holm, L.; Doll, J.; Holm, E.; Pancho, J.; Herberger, J. *World Weeds, Natural Histories and Distribution*; Wiley: New York, 1997; pp 226–235.
- Urbano, J. M.; Borrego, A.; Torres, V.; Leon, J. M.; Jimenez, C.; Dinelli, G.; Barnes, J. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technol.* **2007**, *21*, 396–401.
- Brown, S. M.; Whitwell, T. Influence of tillage on horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Technol.* **1988**, *2*, 269–270.
- Calha, I. M.; Rocha, F.; Ruiz-Santaella, J. P.; Cruz-Hipólito, H. E. Two decades of herbicide resistance in the Iberian Peninsula. *J. Plant Dis. Prot.* **2008**, *21*, 79–84.
- González-Torralva, F.; Cruz-Hipólito, H. E.; Müllender, N.; Domínguez-Valenzuela, J. A.; De Prado, R. Resistance of *Conyza canadensis* to Glyphosate in Spain. In XIIIth International Conference on Weed Biology, Dijon, France, AFPP: Dijon, Francia, 2009; pp 381–386.
- Heap, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds; www.weedscience.com (Accessed October, 2009).
- Recasens, J.; Conesa, J. A. *Malas Hierbas en Plántula: Guía de Identificación*; Ediciones de la Universitat de Lleida: Lleida, Spain, 2009; pp 143–147.
- Dauer, J. T.; Mortensen, D. A.; VanGessel, M. J. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *J. Appl. Ecol.* **2007**, *44*, 105–114.
- Wu, H.; Walker, S.; Rollin, M. J.; Tan, D. K. Y.; Robinson, G.; Werth, J. Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). *Weed Biol. Manage.* **2007**, *7*, 192–199.
- Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M. D.; Heredia, A.; Ruiz-Santaella, J. P.; De Prado, R. Nontarget mechanism involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (11), 4844–4848.
- Weaver, S. E. The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Can. J. Plant Sci.* **2001**, *81*, 867–875.
- Hao, J.-H.; Qiang, S.; Liu, Q.-Q.; Cao, F. Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. *J. Syst. Evol.* **2009**, *47* (3), 245–254.
- Duke, S. O.; Powles, S. B. Glyphosate: A once in a century herbicide. *Pest Manage. Sci.* **2008**, *64*, 319–325.
- Franz, J. E.; Mao, M. K.; Sikorski, J. A. *Glyphosate. A Unique Global Herbicide*; ACS Monograph 189; American Chemical Society: Washington, DC, 1997; 653 pp.
- Ferreira, E. A.; Galon, L.; Aspiázú, I.; Silva, A. A.; Concenco, G.; Silva, A. F.; Oliveira, J. A.; Vargas, L. Glyphosate translocation in hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. *Planta Daninha*. **2008**, *26*, 637–643.
- Steinrücken, H. C.; Amrhein, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *94*, 1207–1212.
- Yu, Q.; Cairns, A.; Powles, S. B. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* **2007**, *225*, 499–513.
- Kaundun, S. S.; Zelaya, I. A.; Dale, R. P.; Lycett, A. J.; Carter, P.; Sharples, K. R.; McIndoe, E. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a Goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Sci.* **2008**, *56*, 637–646.
- Harring, T.; Streibig, J. C.; Husted, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficacy. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4406–4412.
- Hess, M.; Barralis, G.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Eggers, Th.; Hack, H.; Stauss, R. Use of the extended BBCH scale-general for the descriptions of the growth stages of mono and dicotyledonous weed species. *Weed Res.* **1997**, *37*, 433–441.
- Menendez, J.; Bastida, F.; De Prado, R. Resistance to chlortoluron in a downy brome (*Bromus tectorum*) biotype. *Weed Sci.* **2006**, *54*, 237–245.
- Ruiz-Santaella, J. P.; Heredia, A.; De Prado, R. Basis of selectivity of cyhalofop-butyl in *Oryza sativa* L. *Planta* **2006**, *223*, 191–199.
- Gauvrit, C. Glyphosate response to calcium, ethoxylated amine surfactant, and ammonium sulfate. *Weed Technol.* **2003**, *17*, 799–804.
- Grangeot, M.; Chauvel, B.; Gauvrit, C. Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. *Weed Res.* **2006**, *46*, 152–162.
- Perez-Jones, A.; Park, K. W.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C.; Shaner, D. Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Sci.* **2005**, *53*, 775–779.
- Koger, C. H.; Poston, D. H.; Hayes, R. M.; Montgomery, R. F. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technol.* **2004**, *18*, 820–825.
- Shrestha, A.; Hembree, K. J.; Va, N. Growth stage influences level of resistance in glyphosate-resistant horseweed. *Calif. Agric.* **2007**, *61*, 67–70.
- De Ruiter, H.; Uffing, A. J. M.; Meinen, E.; Prins, A. Influence of surfactants and plant species on leaf retention of spray solutions. *Weed Sci.* **1990**, *38*, 567–572.
- Chachalis, D.; Reddy, K. N.; Elmore, C. D.; Steele, M. L. Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among

- Ipomea* species and smallflower morningglory. *Weed Sci.* **2001**, *49*, 628–634.
- (31) Norsworthy, J. K.; Burgos, N. R.; Oliver, L. R. Differences in weed tolerance to glyphosate involved different mechanisms. *Weed Technol.* **2001**, *15*, 725–731.
- (32) Michitte, P.; De Prado, R.; Espinoza, N.; Ruiz-Santaella, J. P.; Gauvrit, C. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Sci.* **2007**, *55*, 435–440.
- (33) Amrhein, N.; Deus, B.; Gehrke, P.; Steinrücken, H. C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiol.* **1980**, *66*, 830–834.
- (34) Mueller, T. C.; Ellis, A. T.; Beeler, J. E.; Sharma, S. D.; Singh, M. Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. *Weed Res.* **2008**, *48*, 455–460.

Received for review December 2, 2009. Revised manuscript received February 26, 2010. Accepted March 2, 2010. This research was conducted with support from the CICYT (AGL2007-0835) research fund.

Detection of Sourgrass (*Digitaria insularis*)
Biotypes Resistant to Glyphosate
in Brazil

De Carvalho, L.B., Cruz-Hipolito, H., **González-Torralva, F.**, Da
Costa Aguiar Alves, P.L., Christoffoleti, P.J. & De Prado, R.
(**2011**). *Weed Science* 59: 171-176.

Detection of Sourgrass (*Digitaria insularis*) Biotypes Resistant to Glyphosate in Brazil

Leonardo Bianco de Carvalho, Hugo Cruz-Hipolito, Fidel González-Torralva, Pedro Luis da Costa Aguiar Alves, Pedro Jacob Christoffoleti, and Rafael De Prado*

Sourgrass is a perennial weed infesting annual and perennial crops in Brazil. Three biotypes (R1, R2, and R3) of sourgrass suspected to be glyphosate-resistant (R) and another one (S) from a natural area without glyphosate application, in Brazil, were tested for resistance to glyphosate based on screening, dose-response, and shikimic acid assays. Both screening and dose-response assays confirmed glyphosate resistance in the three sourgrass biotypes. Dose-response assay indicated a resistance factor of 2.3 for biotype R1 and 3.9 for biotypes R2 and R3. The hypothesis of a glyphosate resistance was corroborated on the basis of shikimic acid accumulation, where the S biotype accumulated 3.3, 5.0, and 5.7 times more shikimic acid than biotypes R1, R2, and R3, respectively, 168 h after treatment with 157.50 g ae ha⁻¹ of glyphosate. There were no differences in contact angle of spray droplets on leaves and spray retention, indicating that differential capture of herbicide by leaves was not responsible for resistance in these biotypes. The results confirmed resistance of sourgrass to glyphosate in Brazil.

Nomenclature: Glyphosate; sourgrass, *Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman, TRCIN.

Key words: Herbicide resistance, shikimic acid, spray retention, contact angle.

Herbicide resistance has been one of the most important challenges in agricultural systems in recent years, with cases of herbicide resistance having increased exponentially in the last three decades (Heap 2010). Strong selection by herbicides has resulted in the widespread evolution of herbicide resistance in populations of agricultural weeds (Jasieniuk et al. 2008). Weed populations evolve resistance in response to repeated treatment with herbicides having the same mechanism of action or metabolic degradation pathway (reviewed in Gressel 2002; Duke and Powles 2008; Powles 2008; Powles and Yu 2010). To date, more than 180 weed species in over 50 countries and 280,000 fields, orchards, or vineyards have been identified having individuals that are resistant to herbicides (Heap 2010).

Resistance to glyphosate is an important example of herbicide resistance. This herbicide has been used extensively in agriculture worldwide for over 30 yr, and, today, it is the most commercialized herbicide in the world (Duke and Powles 2008). Glyphosate has a unique chemical structure and a molecular target site related to the inhibition of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) (EC 2.5.1.19) in the shikimate pathway (Duke et al. 2003). Inhibition of this enzyme results in starvation of EPSP and ensuing metabolic products, such as the aromatic acids phenylalanine, tyrosine, and tryptophan that are required for protein synthesis (Herrman and Weaver 1999; Siehl 1997). However, a more rapid and dramatic effect is the accumulation of precursors of the chorismate pathway, most notably shikimate (Amrhein et al. 1980; Lydon and Duke 1988).

The evolution of glyphosate-resistant weeds is becoming a very significant issue in parts of North and South America (Duke and Powles et al. 2008; Powles and Yu 2010). Today, glyphosate-resistant weed populations have been identified in 15 species and 7 countries of North and South America,

including Brazil (Heap 2010). In Brazil, cases of resistance to glyphosate already have been identified for biotypes of hairy fleabane [*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist] (Vargas et al. 2007; Lamego and Vidal 2008), horseweed [*Conyza canadensis* (L.) Cronquist] (Lamego and Vidal 2008), wild poinsettia [*Euphorbia heterophylla* (L.) (Vidal et al. 2007)], and Italian ryegrass [*Lolium multiflorum* Lam.] (Roman et al. 2004; Vargas et al. 2004), in both annual and perennial crops.

Sourgrass [*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman] is indigenous to tropical and subtropical America. It is an important weed infesting annual and perennial crops in Brazil. This perennial weed reproduces by seeds and rhizomes (Kissman 1997). In addition, the small hairy seeds with a high percentage of germination allow sourgrass to increase rapidly in numbers (Correia and Durigan 2009).

In maize and soybean crops, as well as in coffee and orange orchards of the Southeast of Brazil, sourgrass populations had been selected due to frequent glyphosate applications (Timossi 2009) performed during the last 15 yr. In addition, glyphosate-resistant crops are grown in this area with glyphosate often being the only herbicide used (Powles 2008), meaning sourgrass also might be being selected in transgenic crops. The frequent use of glyphosate could be selecting resistance in sourgrass populations in the agricultural areas of Brazil.

Due to the importance of sourgrass as a weed and the fact that this species has been reported as being glyphosate-resistant, the objectives of this research were: (1) to detect different glyphosate-resistant biotypes of sourgrass in Brazil by evaluating the response to glyphosate application and the accumulation of shikimic acid; and (2) to study the herbicide spray retention and the contact angle of droplets.

Materials and Methods

Chemicals. Commercial glyphosate formulation¹ was used for all assays, and all other reagents were purchased at analytical grade.

Plant Material and Growing Conditions. Seeds from suspected glyphosate-resistant sourgrass plants were harvested

DOI: 10.1614/WS-D-10-00113.1

*First and fourth authors: Doctorate Student and Professor, Department of Applied Biology to Agropecuária, São Paulo State University, Brazil 14884-900; second, third, and sixth authors: Eng Agron Ph.D, Doctorate Student, and Professor, Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Córdoba, Spain 14071; fifth author: Professor, Department of Crop Science, University of São Paulo, Brazil 13418-900. Corresponding author's E-mail: agrolbcarvalho@gmail.com

(and stored separately) from locations within São Paulo State, Brazil, in 2009. These fields had been treated for at least the past 15 yr with glyphosate at 720 g ae ha⁻¹. Sampled populations were screened using the field rate, and then seeds of the plants surviving the glyphosate application were used in this study, hereafter referred to as biotypes R1, R2, and R3 from the cities of Itapira (22°26'00"S and 46°49'18"WGr), Jaboticabal (21°15'17"S and 48°19'20"WGr) and Matão (21°36'12"S and 48°21'57"WGr), respectively. Biotypes R1 and R3 were collected from orange orchards and the R2 biotype was collected from annual crop field where 720 g ae ha⁻¹ of glyphosate did not control this weed. In addition, seeds of the species also were collected from natural areas never treated with herbicides in Itacemópolis city (22°34'50"S and 47°31'07"W), hereafter referred to as biotype S. All experiments were carried out in a growth chamber² at 28/18 °C (day/night) in a 16-h photoperiod under 850 μmol m⁻² s⁻¹ photosynthetic photon-flux density delivered by a mixture of incandescent and fluorescent lights, with an 80% relative humidity.

Petri Dish Screening Assay. Experiments were conducted using 9-cm-diam Petri dishes containing two sheets of filter paper, with 25 seeds per biotype scattered over the surface of the filter paper. Five-milliliter aliquots of different glyphosate concentrations (0, 18.75, 37.50, 75.00, 150.00, and 225.00 mg ae L⁻¹ to the susceptible biotype and 0, 37.50, 75.00, 150.00, 262.50, and 375.00 mg ae L⁻¹ to the resistant biotypes) were poured into the dishes and transferred to the growth chamber. Ten days after treatment, seedling fresh weight was determined for each biotype and expressed as the percentage of the untreated control. The experiments were arranged in a completely randomized design with three replicates and repeated twice.

Whole-Plant Dose-Response Assay. Seedlings were grown in 500 ml plastic pots containing a 1 : 2 (v : v) mixture of peat and sandy loam, maintaining two plants per pot. Treatments were applied to plants of all biotypes at the 3-leaf growth stage using a laboratory tracking sprayer³ equipped with a flat-fan nozzle⁴ delivering a spray volume of 200 L ha⁻¹ at 200 kPa. For the susceptible biotype, glyphosate was tested using eight rates (0, 52.50, 105.00, 131.25, 157.50, 183.75, 210.00, and 262.50 g ae ha⁻¹). For the resistant biotypes, glyphosate was tested using 10 rates (0, 52.50, 105.00, 157.50, 210.00, 262.50, 315.00, 367.50, 420.00, and 525.00 g ae ha⁻¹). Twenty-one days after treatment, aboveground fresh weight per plant was determined and expressed as percentage of the untreated control. The experiments were arranged in a completely randomized design with three replicates and repeated three times.

Shikimic Acid Assay. Seedlings were grown as previously described, with just one plant per pot. Treatments were applied to plants of all biotypes at the 6-leaf growth stage using glyphosate at 157.50 g ae ha⁻¹. Plants of all biotypes were harvested for shikimic acid extraction 24, 48, 72, 96, and 168 hours after treatment (HAT). Leaf tissues were homogenized (0.05 g of fresh weight), and samples were frozen in liquid nitrogen following the protocol of Singh and Shaner (1998) as modified by Perez-Jones et al. (2007). Shikimic acid accumulation was determined using a spectro-

photometer.⁵ The standard curve was determined using untreated plants and a known concentration of shikimic acid.⁶ The experiments were arranged in a completely randomized design with seven replicates and repeated twice.

Spray Retention Assay. The methodology described by González-Torralva et al. (2010) was followed. Plants of each sourgrass biotype at the 3-leaf stage were sprayed with a colored glyphosate solution using the spray chamber as described above. Treatment solutions contained glyphosate at 157 g ae ha⁻¹ in a volume of 200 L and 100 mg L⁻¹ fluorescein-sodium indicator.⁷ After the solution had dried on the foliage, plants were cut off at ground level and immersed for 30 s in 50 ml of 5 mM NaOH. Readings were made with a spectrofluorimeter⁸ at 490/510 nm. Plants were then placed at 80 °C for 72 h, and the dry matter was recorded. Ten plants were used for each biotype. The experiments were repeated twice.

Contact Angle Assay. The second leaf of each sourgrass biotype at the 5-leaf stage was cut off and placed on a horizontal surface. Each leaf was treated with three droplets of 1 μL of glyphosate corresponding to 157 g ae ha⁻¹ in a volume of 200 L. Droplets were applied in the center of the adaxial surface. The pattern of droplet deposition was observed in a horizontal microscope.⁹ Images were captured with a camera¹⁰ plus Supermacro lens¹¹ adapted to one of the oculars of the microscope. The droplets were applied every 20 s. The contact angle was obtained by digital image analysis software.¹² Five plants were used for each biotype. The experiments were repeated twice.

Statistical Analysis. In each study, there was no interaction between treatments and experimental repetitions detected by previous ANOVA test, so all data were pooled across experimental repetitions for further analysis and presentation. For each biotype, both seedling and aboveground fresh weight data were fitted to a nonlinear, log-logistic regression model (Equation 1):

$$Y = c + \{(d - c) / [1 + (x/g)^b]\} \quad [1]$$

where Y is the seedling fresh weight or the aboveground fresh weight expressed as a percentage of the untreated control, c and d are the coefficients corresponding to the lower and upper asymptotes, b is the slope of the line, g is the herbicide rate at the point of inflection halfway between the upper and lower asymptotes, and x is the herbicide rate used.

The herbicide rates needed to inhibit seedling (EC₅₀) and aboveground (ED₅₀) fresh weight by 50% compared to the untreated control can be determined, represented by the point of inflection of the regression equation above. The resistant factor (RF) was also computed as (Equation 2):

$$RF = EC_{50}(R)/EC_{50}(S) \text{ or } RF = ED_{50}(R)/ED_{50}(S) \quad [2]$$

Regression analysis was computed using Sigma Plot statistical software.¹³

Spray retention and contact angle data were submitted to ANOVA and the means were compared using Tukey's honestly significant difference (HSD) test at the 5% probability level. Analyses of variance and Tukey HSD test were computed using Statistix statistical software.¹⁴

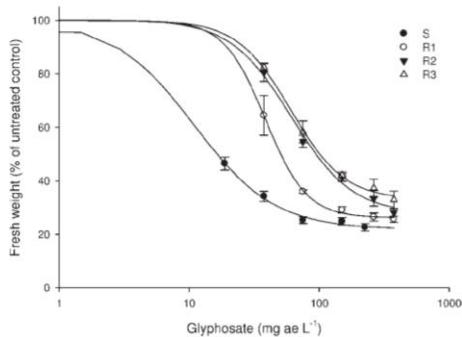


Figure 1. Petri dish screening assay of different biotypes of sourgrass. The seedling fresh weight was determined 10 d after treatment, and data were expressed as percentage of the untreated control. Vertical bars represent \pm standard errors of the mean.

Results and Discussion

Petri Dish Screening and Whole-Plant Dose-Response Assays. Seedling fresh weight of biotypes S, R1, R2, and R3 decreased when the glyphosate rate increased (Figure 1). However, there was a different response to herbicide concentration between the glyphosate-resistant biotypes and the glyphosate-susceptible biotype. In addition, there was also a different level of resistance to glyphosate among the resistant biotypes. The EC_{50} for the biotype S was $10.9 \text{ mg ae L}^{-1}$ (Table 1). Thus, biotype R1 showed a resistance factor of 3.5, whereas biotypes R2 and R3 showed resistance factors of 5.6 and 5.5, respectively. Therefore, biotypes R2 and R3 were more resistant than biotype R1 in this assay.

Aboveground fresh weight of the S biotype decreased when the glyphosate rate increased (Figure 2). Glyphosate reduced the fresh weight less for the resistant biotypes than for the susceptible biotype. However, the biomass of biotypes R1, R2, and R3 was reduced at high glyphosate rates. The ED_{50} for the S biotype was $63.9 \text{ g ae ha}^{-1}$ whereas R1, R2, and R3 biotypes showed ED_{50} of 148.8, 249.0, and $248.1 \text{ g ae ha}^{-1}$, respectively (Table 2). Thus, the biotype R1 showed a resistance factor of 2.3, and the R2 and R3 biotypes both showed a resistance factor of 3.9. Therefore, biotypes R2 and R3 were more resistant than biotype R1 in this assay, as well.

Both Petri dish screening and pot dose-response assays indicated that resistance to glyphosate was present in three biotypes of sourgrass in Brazil. However, the Petri dish assay provided a higher resistance factor than the dose-response

assay. This is similar to results obtained on *Lolium* spp. by Perez and Kogan (2003), Perez-Jones et al. (2007), and Ribeiro et al. (2008). The Petri dish assay for glyphosate resistance screening is a simple, quick, and inexpensive method that has been used to quantify herbicide resistance (Neve et al. 2004; Perez and Kogan 2003; Perez-Jones et al. 2007; Ribeiro et al. 2008). However, the pot dose-response assay is more accurate because it directly quantifies the herbicide resistance (Cruz-Hipolito et al. 2009; Perez-Jones et al. 2007; Ribeiro et al. 2008). Therefore, in a situation where several weed biotypes are to be tested for glyphosate resistance, the Petri dish assay can be used effectively, but the results obtained always should be confirmed with a whole-plant assay (Perez-Jones et al. 2007).

According to the dose-response assay, the three resistant biotypes showed a lower resistance factor than other grass weeds studied, such as goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.] (Lee and Ngim 2000), Italian ryegrass (Perez-Jones et al. 2005, 2007; Ribeiro et al. 2008), rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) (Ribeiro et al. 2008; Wakelin and Preston 2006), and johnsongrass [*Sorghum halepense* (L.) Pers.] (Vila-Aiub et al. 2007). However, there was a difference in dose response among the resistant biotypes, with biotypes R2 and R3 being more resistant than R1. Therefore, two sourgrass biotypes had a higher level of glyphosate resistance and one biotype had a lower level of resistance.

Shikimic Acid Assay. Shikimic acid concentration increased slightly after glyphosate application in biotypes R1, R2, and R3 (Figure 3). The concentration of shikimic acid in the S biotype was similar to the resistant biotypes up to 72 HAT. However, a strong accumulation of shikimic acid was observed in the S biotype after 72 HAT. Shikimic acid accumulation in the leaf tissue 168 h after glyphosate application was 3.3, 5.0, and 5.7 times greater in the S biotype than in biotypes R1, R2, and R3, respectively.

A high accumulation of shikimic acid in the S biotype indicated susceptibility to glyphosate. On the other hand, low or no accumulation of shikimic acid in biotypes R1, R2, and R3 indicated low or no susceptibility to glyphosate. Elevated shikimic acid accumulation is used as an early and highly sensitive indicator of glyphosate effects on glyphosate-sensitive plant tissues (Harring et al. 1998). Changes in shikimic acid levels in plants are specifically the result of inhibition of EPSPS (Amrhein et al. 1980, 1983; Jaworski 1972) and have been used as a marker for EPSPS sensitivity in plants to glyphosate (De María et al. 2006; González-Torralva et al. 2010; Mueller et al. 2008). The greater accumulation of shikimic acid in the S biotype further confirmed that biotypes R1, R2, and R3 were glyphosate-resistant.

Table 1. Parameters of the log-logistic equation^a used to calculate the herbicide concentration required for 50% reduction of the seedling fresh weight of susceptible (S) and resistant (R1, R2, and R3) sourgrass biotypes by Petri dish screening test. Data are mean \pm standard error of three replicates.

Biotype	c	d	b	g	R ²	RF ^b
S	21.8 \pm 0.8	100.0 \pm 1.0	1.4 \pm 0.2	10.9 \pm 0.9	0.99**	1.0
R1	26.2 \pm 1.0	100.0 \pm 1.6	2.7 \pm 0.3	38.5 \pm 1.5	0.99**	3.5
R2	27.7 \pm 1.8	100.3 \pm 1.5	1.8 \pm 0.2	60.8 \pm 3.4	0.99**	5.6
R3	33.0 \pm 1.5	100.1 \pm 1.4	2.1 \pm 0.2	60.3 \pm 3.0	0.99**	5.5

^a Equation $Y = c + [(d - c) / (1 + (x/g)^b)]$, where Y is the seedling fresh weight, c and d are the lower and upper asymptotes, b is the slope of the line, g is the herbicide rate required for 50% seedling fresh weight (EC_{50}), and x is the herbicide rate.

^b Abbreviation: RF, resistant factor = $EC_{50}(R) / EC_{50}(S)$.

** Indicates regression model significance of the coefficient of determination at the 0.01 level of probability.

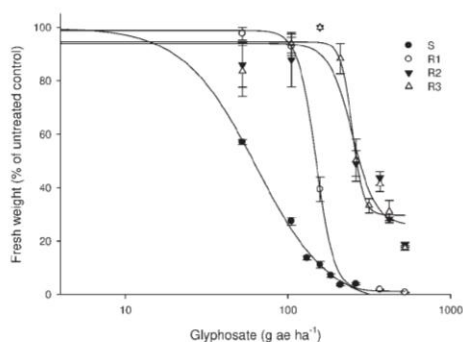


Figure 2. Pot dose-response assays of different biotypes of sourgrass. The plant fresh weight was determined 21 d after treatment, and data were expressed as percentage of the untreated control. Vertical bars represent \pm standard errors of the mean.

The susceptible sourgrass plants had slower shikimic acid accumulation, as well as a lower concentration than other grass weeds studied, such as Italian ryegrass (Perez-Jones et al. 2005, 2007; Ribeiro et al. 2008) and rigid ryegrass (Ribeiro et al. 2008). This fact indicates that the glyphosate uptake might be slower in this weed species, because the accumulation of shikimic acid is an indicator of whether or not glyphosate is reaching the target enzyme (Powles and Preston 2006).

Spray Retention and Contact Angle Assays. The four biotypes of sourgrass showed similar results for spray retention and contact angle of droplets (Table 3). Spray retention and contact angle are important parameters of herbicide efficacy because they determine the maximum amount of herbicide that can be captured by the target plant; in some cases, differences in spray retention and contact angle are thought to play a role in herbicide efficacy and selectivity (Chachalis et al. 2001; Kogan and Perez 2003; Michitte et al. 2007; Norsworthy et al. 2001). This indicates that differential capture of herbicide by leaves was not responsible for resistance in these biotypes.

It is essential to know whether or not a lack of weed control after glyphosate application results from herbicide resistance or other reasons (Duke and Powles 2008; Powles 2008). For example, when using herbicides at a sublethal dose, some plants are affected but survive, and therefore, there can be a rapid resistance evolution (Neve and Powles 2005a,b). In the case of sourgrass, plants cannot be killed using glyphosate when the herbicide is applied after the plant develops

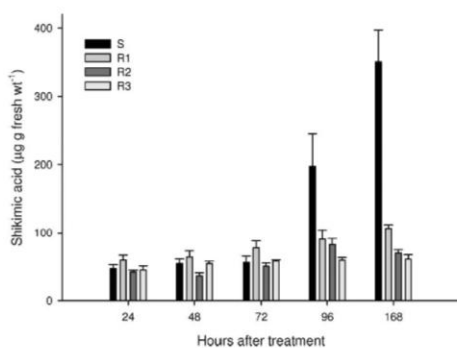


Figure 3. Shikimic acid accumulation in leaves of sourgrass plants following the application of glyphosate at 157.50 g ae ha⁻¹. Vertical bars represent \pm standard errors of the mean.

rhizomes or attains the flowering stage (Machado et al. 2006; Timossi et al. 2006). On the other hand, seedlings can be controlled successfully. The use of glyphosate on advanced growth-stage plants may have exacerbated the development of glyphosate resistance in sourgrass.

Using the identification of herbicide-resistant weeds as a first step in resistance management demands an efficient and effective screening test; only after obtaining an accurate diagnosis can the nature, distribution and abundance of resistant weed populations be monitored (Perez and Kogan 2003). In addition, understanding the factors influencing the evolution of glyphosate resistance will help delay the appearance of resistance (Preston et al. 2009). For sourgrass, the main factors can be cited as intensive use of glyphosate and the lack of other weed management practices. Orchards and fallow situations are at high risk of glyphosate resistance evolution. Thus, changing management practices to include other weed control tactics will help delay the evolution of glyphosate resistance in this species, whereas the use of glyphosate as the only control method will exacerbate glyphosate resistance.

This research confirmed three biotypes of sourgrass resistant to glyphosate in Brazil, infesting annual crop fields and orange orchards. Because the sourgrass resistance to glyphosate was confirmed, researchers' efforts have to be geared to developing integrated management programs for controlling this important weed in Brazil. Moreover, further research should be performed to determine the mechanisms of glyphosate resistance for this weed.

Table 2. Parameters of the log-logistic equation^a used to calculate the herbicide dose required for 50% reduction of the aboveground fresh weight of susceptible (S) and resistant (R1, R2, and R3) sourgrass biotypes by pot dose-response test. Data are mean \pm standard error of six replicates.

Biotype	c	d	b	g	R ²	RF ^b
S	2.9 \pm 0.8	99.9 \pm 1.1	1.9 \pm 0.1	63.9 \pm 1.3	0.99**	1.0
R1	1.2 \pm 1.1	98.8 \pm 1.2	7.8 \pm 0.6	148.8 \pm 1.6	0.99**	2.3
R2	25.7 \pm 5.4	94.1 \pm 2.6	6.0 \pm 1.6	249.0 \pm 14.1	0.87**	3.9
R3	29.7 \pm 3.2	94.6 \pm 2.1	12.5 \pm 4.1	248.1 \pm 8.1	0.89**	3.9

^a Equation $Y = c + [(d - c) / (1 + (x/g)^b)]$, where Y is the aboveground fresh weight, c and d are the lower and upper asymptotes, b is the slope of the line, g is the herbicide rate required for 50% aboveground fresh weight (ED₅₀), and x is the herbicide rate.

^b Abbreviation: RF, resistant factor = ED₅₀(R) / ED₅₀(S).

** Indicates regression model significance of the coefficient of determination at the 0.01 level of probability.

Table 3. Spray retention and contact angle of glyphosate solution for susceptible (S) and resistant (R1, R2, and R3) sourgrass biotypes.

Biotype	Spray retention ^a (μl spray solution g ⁻¹ dry matter)	Contact angle ^a (degrees)
S	209.0 ± 3.2 A	108.2 ± 2.5 A
R1	213.9 ± 7.5 A	106.8 ± 3.0 A
R2	206.7 ± 5.9 A	104.0 ± 4.9 A
R3	214.7 ± 8.2 A	109.0 ± 0.8 A

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level as determined by the Tukey HSD test. Mean values ± standard errors of the mean.

Sources of Materials

- Roundup Energy, 450 g ai L⁻¹, Monsanto, Brussels, Belgium.
- Growth chamber, AM0705020, Eldon, Tussendiepen, The Netherlands.
- Laboratory tracking sprayer, SBS-060, DeVries Manufacturing, Hollandale, Holland.
- Flat-fan nozzles, 80.02E VS, TeeJet MidTech Southest, Tifton, GA.
- Spectrophotometer, DU-640, Beckman Coulter, Fullerton, CA.
- Shikimic acid, S5375-1G 026K1039, Sigma-Aldrich, St Louis, MO.
- Fluorescein-sodium indicator, CI 45350 K37052987 724, Merck, Darmstadt, Germany.
- Spectrofluorimeter, F-2500, Hitachi, Tokyo, Japan.
- Horizontal microscope, MZ6 1.8X-4X, Leica, Oberkochen, Germany.
- Camera, Digilux 4.3 (1.2–8–4.5/8.3–24.9 mm), Leica, Oberkochen, Germany.
- Supermacro lens, Digimacro 4.3, Leica, Oberkochen, Germany.
- Digital image analysis software, ImageJ 1.43u, NIH, Bethesda, MD.
- Sigma Plot statistical software, Version 10.0, Systat Software, San Jose, CA.
- Statistix statistical software, Version 8.0, Analytical Software, St Paul, MN.

Acknowledgments

This research was jointly supported by the Brazilian CNPq Sandwich Doctorate Scholarship project 201417/2009-0 to the first author and the MICINN (Spain) project AGL2007-60771.

Literature Cited

- Amrhein, N., B. Deus, P. Gehrke, and H. C. Steinrücken. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. *Plant Physiol.* 66:830–834.
- Amrhein, N., D. Johanning, J. Schab, and A. Schulz. 1983. Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. *FEBS Lett.* 157:191–196.
- Chachalis, D., K. N. Reddy, C. D. Elmore, and M. L. Steele. 2001. Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among *Ipomoea* species and smallflower morningglory. *Weed Sci.* 49:628–634.
- Correia, N. M. and J. C. Durigan. 2009. Chemical management of adult *Digitaria insularis* with glyphosate alone and mixture with chlorimuron-ethyl or quizalofop-p-terfuryl in a no-tilled field. *Bragantia* 68:689–697.
- Cruz-Hipolito, H., M. D. Osuna, A. Heredia, J. P. Ruiz-Santalla, and R. De Prado. 2009. Nontarget mechanism involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *J. Agric. Food Chem.* 57:4844–4848.

- De María, N., J. M. Becerril, J. I. García-Plazaola, A. Hernández, M. R. De Felipe, and M. Fernández-Pascual. 2006. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation. *J. Agric. Food Chem.* 54:2621–2628.
- Duke, S. O., S. R. Baerson, and A. M. Rimando. 2003. Herbicides: glyphosate. Pages 708–869 in J. R. Plimmer, D. W. Gammon, and N. N. Ragsdale, eds. *Encyclopedia of Agrochemicals*. New York: John Wiley, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/047126363X.agr119/full>, Accessed: November 30, 2010.
- Duke, S. O. and S. B. Powles. 2008. Glyphosate: a once in a century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64:319–325.
- González-Torralva, F., H. Cruz-Hipolito, F. Basinda, N. Müllerer, R. J. Smeda, and R. De Prado. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 58:4361–4366.
- Gressel, J. 2002. Evolution of resistance to herbicides. Pages 78–121 in J. Gressel, ed. *Molecular Biology of Weed Control*. New York: Taylor & Francis.
- Harring, T., J. C. Streibig, and S. Husted. 1998. Accumulation of shikimic acid: a technique for screening glyphosate efficacy. *J. Agric. Food Chem.* 46:4406–4412.
- Heap, I. M. 2010. International Survey of Herbicide-Resistant weeds. <http://www.weedsience.org>. Accessed: June 6, 2010.
- Herrman, K. M. and L. M. Weaver. 1999. The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:473–503.
- Jasieniak, M., R. Ahmad, A. M. Sherwood, J. L. Firestone, A. Perez-Jones, W. T. Lanini, C. Mallory-Smith, and Z. Stednick. 2008. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. *Weed Sci.* 56:496–502.
- Jaworski, E. G. 1972. Mode of action of *N*-phosphonomethyl-glycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 20:1195–1198.
- Kissmann, K. G. 1997. *Digitaria insularis*. Pages 510–513 in K. G. Kissmann, ed. *Plantas Infestantes e Nocivas*, Tomo I. São Paulo: BASF.
- Kogan, M. and A. Perez. 2003. Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Chile: EUCVCE. 333 p.
- Lamego, F. P. and R. A. Vidal. 2008. Resistance to glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. *Planta Daninha* 26:467–471.
- Lee, L. J. and J. Ngim. 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Echinochloa indica* (L.) Gaertn.) in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56:336–339.
- Lydon, J. and S. O. Duke. 1988. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *J. Agric. Food Chem.* 36:813–818.
- Machado, A.F.L., L. R. Ferreira, F. A. Ferreira, C.M.T. Fialho, L. D. Tuffi Santos, and M. S. Machado. 2006. Growth analysis of *Digitaria insularis*. *Planta Daninha* 24:641–647.
- Mitcher, P., R. De Prado, N. Espinoza, J. P. Ruiz-Santalla, and C. Gauvrit. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Sci.* 55:435–440.
- Mueller, T. C., A. T. Ellis, J. E. Beeler, S. D. Sharma, and M. Singh. 2008. Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. *Weed Res.* 48:455–460.
- Neve, P. and S. B. Powles. 2005a. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theor. Appl. Genet.* 110:1154–1166.
- Neve, P. and S. B. Powles. 2005b. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. *Heredity* 95:485–492.
- Neve, P., J. Sadler, and S. B. Powles. 2004. Multiple herbicide resistance in a glyphosate-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype. *Weed Sci.* 52:920–928.
- Norsworthy, J. K., N. R. Burgos, and L. R. Oliver. 2001. Differences in weed tolerance to glyphosate involved different mechanisms. *Weed Technol.* 15:725–731.
- Perez, A. and M. Kogan. 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Res.* 43:12–19.
- Perez-Jones, A., K. W. Park, J. Colquhoun, C. Mallory-Smith, and D. Shaner. 2005. Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Sci.* 53:775–779.
- Perez-Jones, A., K. W. Park, N. Polge, J. Colquhoun, and C. A. Mallory-Smith. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226:395–404.
- Powles, S. B. 2008. Review. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag. Sci.* 64:360–365.
- Powles, S. B. and C. Preston. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Tech.* 20:282–289.
- Powles, S. B. and Q. Yu. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:317–347.

- Preston, C., A. M. Wakelin, F. C. Dolman, Y. Bostamam, and P. Boutsalis. 2009. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Sci.* 57:435–441.
- Ribeiro, D. N., D. Gil, H. E. Cruz-Hipolito, J. P. Ruiz-Santaella, P. J. Christoffoli, R. A. Vidal, and R. De Prado. 2008. Rapid assays for detection of glyphosate-resistant *Lolium* spp. *J. Plant Dis. Prot.* 21:95–99.
- Roman, E. S., L. Vargas, M. A. Rizzardi, and R. W. Mattei. 2004. Resistance of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) to glyphosate. *Planta Daninha* 22:301–306.
- Siehl, D. L. 1997. Inhibitors of EPSPS synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. Pages 37–67 in R. M. Roe, J. D. Burton, and R. J. Kuhr, eds. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular biology*. Amsterdam: IOS Press.
- Singh, B. K. and D. L. Shaner. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Tech.* 12:527–530.
- Timossi, P. C. 2009. Management of *Digitaria inularis* sprouts under no-till corn cultivation. *Planta Daninha* 27:175–179.
- Timossi, P. C., G. J. Leite, and J. C. Durigan. 2006. Efficacy of glyphosate in cover crops. *Planta Daninha* 24:475–480.
- Vargas, L., M. A. Bianchi, M. A. Rizzardi, D. Agostinetto, and T. Dal Magro. 2007. *Conyza bonariensis* biotypes resistant to the glyphosate in Southern Brazil. *Planta Daninha* 25:573–578.
- Vargas, L., E. S. Roman, M. A. Rizzardi, and V. C. Silva. 2004. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotypes in apple orchards. *Planta Daninha* 22:617–622.
- Vidal, R. A., M. T. Michelangelo, R. De Prado, J. P. Ruiz-Santaella, and M. Vila-Aiub. 2007. Glyphosate-resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. *Int. J. Food Agric. Environ.* 5:265–269.
- Vila-Aiub, M. M., M. C. Balbi, P. E. Gundel, C. M. Ghersa, and S. B. Powles. 2007. Evolution of glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Sci.* 55:566–571.
- Wakelin, A. M. and C. Preston. 2006. Inheritance of glyphosate resistance in several populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from Australia. *Weed Sci.* 54:212–219.

Received August 6, 2010, and approved November 4, 2010.

Pool of Resistance Mechanisms to Glyphosate in
Digitaria insularis

De Carvalho, L.B., Alves, P.L.D.C.A., **González-Torralva, F.**, Cruz-Hipolito, H.E., Rojano-Delgado, A.M., De Prado, R., Gil-Humanes, J., Barro, F. & Luque De Castro, M.D. (2012). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 615-622.

Pool of Resistance Mechanisms to Glyphosate in *Digitaria insularis*

Leonardo Bianco de Carvalho* and Pedro Luis da Costa Aguiar Alves

Department of Applied Biology to Agropecuary, São Paulo State University, 14884-900 Jaboticabal, Brazil

Fidel González-Torralva, Hugo Enrique Cruz-Hipolito, Antonia María Rojano-Delgado, and Rafael De Prado

Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

Javier Gil-Humanes and Francisco Barro

Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, E-14080 Córdoba, Spain

María Dolores Luque de Castro

Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

ABSTRACT: *Digitaria insularis* biotypes resistant to glyphosate have been detected in Brazil. Studies were carried out in controlled conditions to determine the role of absorption, translocation, metabolism, and gene mutation as mechanisms of glyphosate resistance in *D. insularis*. The susceptible biotype absorbed at least 12% more ^{14}C -glyphosate up to 48 h after treatment (HAT) than resistant biotypes. High differential ^{14}C -glyphosate translocation was observed at 12 HAT, so that >70% of the absorbed herbicide remained in the treated leaf in resistant biotypes, whereas 42% remained in the susceptible biotype at 96 HAT. Glyphosate was degraded to aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyoxylate, and sarcosine by >90% in resistant biotypes, whereas a small amount of herbicide (up to 11%) was degraded by the susceptible biotype up to 168 HAT. Two amino acid changes were found at positions 182 and 310 in EPSPS, consisting of a proline to threonine and a tyrosine to cysteine substitution, respectively, in resistant biotypes. Therefore, absorption, translocation, metabolism, and gene mutation play an important role in the *D. insularis* glyphosate resistance.

KEYWORDS: *N*-phosphonomethylglycine, EPSPS, weed resistance, mechanisms of resistance, sourgrass

■ INTRODUCTION

Glyphosate herbicide has been used extensively in agriculture worldwide for about 30 years, and it is the most commercialized herbicide in the world.¹ Glyphosate has a unique chemical structure and a molecular target site related to the inhibition of the shikimate pathway. The inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) (EC 2.5.1.19) results in starvation of EPSP and ensuing metabolic products, such as the aromatic acids phenylalanine, tyrosine, and tryptophan that are required for protein synthesis. The inhibition of the shikimate pathway causes its deregulation, resulting in carbon flow from other pathways, leading to disruption of other metabolic pathways.²

Frequent glyphosate applications performed during the past 15 years in no-tilled fields and orchard plantations have been selecting *Digitaria insularis* populations in southeastern Brazil. The species is indigenous to tropical and subtropical America. It is an important weed infesting annual and perennial crops in Brazil. This perennial weed reproduces by seeds and rhizomes. In addition, the small hairy seeds with a high percentage of germination allow *D. insularis* to be a high potential infesting weed.³

Strong selection by herbicides has resulted in the widespread evolution of herbicide resistance in populations of agricultural weeds. Weed populations evolve resistance in response to repeated treatment with herbicides having the same mechanism of action or metabolic degradation pathway.^{1,4} Therefore, the selection pressure caused by the use of glyphosate is causing the selection of *D. insularis* populations resistant to glyphosate in agricultural areas of Brazil.³

Herbicide resistance has been one of the most important challenges in agricultural areas in past years.³ In addition, population shifts toward glyphosate-resistant weeds are becoming a very significant issue in parts of North and South America.^{1,4} Today, in the American continent, glyphosate-resistant weed populations have been identified in 15 species and 7 countries, including Brazil.⁵ In Brazil, cases of resistance to glyphosate have already been published on biotypes of *Conyza bonariensis*,^{6,7} *Conyza canadensis*,⁷ *D. insularis*,³

Received: October 8, 2011

Revised: December 7, 2011

Accepted: December 16, 2011

Published: December 16, 2011

Euphorbia heterophylla,⁸ and *Lolium multiflorum*,^{9,10} in both annual and perennial crops.

Three relevant factors endowing herbicide resistance in weeds are target enzyme sensitivity, increased herbicide metabolism, and impaired herbicide accumulation at the site of action.^{11,12} Glyphosate resistance in weeds has been found to be due to two main mechanisms defined as nontarget site (reduced absorption and/or translocation and vacuolar sequestration) and target site resistance (mutation and gene amplification). Glyphosate resistance due to reduced absorption and/or translocation has been described in resistant biotypes of *Conyza* spp.,^{13,14} *C. bonariensis*,¹⁵ *Lolium rigidum*,¹⁶ and *L. multiflorum*.^{17,18} Glyphosate resistance due to vacuolar sequestration was described for *C. canadensis*.¹⁹ Different mutations on the EPSPS gene have been reported to confer resistance in *Eleusine indica*,^{20,21} *L. rigidum*,^{16,27} and *L. multiflorum*.¹⁸ EPSPS gene amplification was found to confer glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*.²³ However, metabolism of glyphosate has not been found to be a mechanism of resistance.^{12,13,24}

The general objective of this research was to identify the resistance mechanisms involved in the glyphosate-resistant *D. insularis* species. The specific objectives were to determine (1) shikimic acid responses, (2) absorption and translocation of ¹⁴C-glyphosate, (3) glyphosate metabolism, and (4) mutation-(s) in the EPSPS gene, in biotypes of *D. insularis* from Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Shikimic acid (Sigma-Aldrich), commercial herbicide formulation with 45% of glyphosate SL (Monsanto), [¹⁴C]-glyphosate-(phosphonomethyl), specific activity of 52 mCi mmol⁻¹ (American Radiolabel Chemicals), TRIzol reagent (Invitrogen), TURBO DNase (Ambion), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) (Invitrogen), oligo(dT)₁₂₋₁₈ and random nonamers (Amersham Biosciences), nonproofreading (*Thermus thermophilus*) and proofreading (*Pyrococcus furiosus*) polymerases (BioTools), and ExoSAP-IT (USB Corp.) were used in this study. All other reagents were purchased at analytical grade.

Plant Material. Seeds from suspected glyphosate-resistant *D. insularis* plants (hereafter referred to as resistant biotypes R1 and R2) were harvested from agricultural fields treated for at least 15 continuous years with glyphosate herbicide. In addition, seeds of the species were collected from a natural area never treated with herbicides (hereafter referred to as biotype S). Biotype R1 was collected from an annual crop field, whereas biotype R2 was gathered from an orange orchard, in 2009. In both fields, located within São Paulo State in Brazil, these biotypes were not controlled using glyphosate at 1440 g acid equivalent per hectare (g ae ha⁻¹). All biotypes were previously tested for glyphosate resistance. The glyphosate rate required to inhibit above-ground fresh weight by 50% in the susceptible biotype was 148.8 g ae ha⁻¹, and the resistance factor was 3.90 for both R1 and R2 biotypes.³

Growing Conditions. Experiments were conducted in 300 mL plastic pots containing a 1:2 (v/v) mixture of peat and sandy loam, maintaining just one plant per pot. All experiments were performed twice and carried out in a growth chamber model AM0705020 (Eldon) at 28/18 °C (day/night) in a 16 h photoperiod under 850 μmol m⁻² s⁻¹ photosynthetic photon-flux density delivered by a mixture of incandescent and fluorescent lights, with an 80% relative humidity.

Glyphosate Application Conditions. For shikimic acid accumulation and metabolism studies glyphosate was applied at 157.5 g ae ha⁻¹. Glyphosate application was performed on resistant and susceptible plants of all biotypes at the four-leaf growth stage using a laboratory tracking sprayer model SBS-060 (DeVries) equipped with a flat-fan nozzle model 80.02E VS (Tejet), delivering a spray volume

of 200 L ha⁻¹ at 200 kPa. For absorption and translocation studies, glyphosate was applied with a microapplicator model PB 600 TA (Hamilton) at the following described concentrations.

Shikimic Acid Extraction. The protocol of Singh and Shaner as modified by Perez-Jones et al.²⁵ was followed for the extraction of shikimic acid. Plants of all biotypes were harvested for shikimic acid extraction at 24, 48, 72, 96, and 168 hours after treatment (HAT). Leaf tissues (50 mg of fresh weight) were homogenized in a hydrochloric acid solution (treated plants) and some known concentration shikimic acid solutions (untreated plants), and then all samples were frozen in liquid nitrogen. Subsequently, all samples were incubated, mixed with a periodic and metaperiodic acid solution, incubated again, and mixed with a sodium hydroxide and sodium sulfate solution. Shikimic acid accumulation was determined by using a spectrophotometer model DU-640 (Beckman Coulter). The standard curve was determined by using untreated plants and a known concentration of shikimic acid. Shikimic acid accumulation was determined by the difference between shikimic acid concentrations found in treated and untreated plants. The experiments were arranged in a completely randomized design with seven replicates.

Absorption and Translocation Studies. The protocol used by González-Torralva et al.²⁶ was followed for absorption and translocation studies. [¹⁴C]-glyphosate was mixed with commercially formulated glyphosate to prepare emulsions with a specific activity of approximately 50000 dpm μL⁻¹ (both absorption and translocation studies) and a glyphosate concentration of 3.6 g ae L⁻¹ (corresponding to 720 g ae ha⁻¹ at 200 L ha⁻¹). The labeled herbicide was applied to the adaxial surface of the second leaf of each plant in one 1.0 μL droplet. At 12, 24, 48, 72, and 96 HAT, unabsorbed [¹⁴C]-glyphosate was removed from the leaf surface by rinsing the treated area with 3 mL of acetone 50% (v/v). Rinses from batches of five replicates of plants were pooled and analyzed by liquid scintillation spectrometry (LSS) using a scintillation counter model LS 6500 (Beckman Counter). Plants of all biotypes were also harvested in each batch at the same times and separated into treated leaf, root, and the rest of the shoot. The plant tissue was dried at 55 °C for 72 h and combusted in a Packard Tri Carb 307 sample oxidizer. The ¹⁴CO₂ evolved was trapped and counted in a 10 mL mixture of Carbo-Sorb E and Permafluor E+ (3:7, v/v) (Perkin-Elmer). The radioactivity was quantified by LSS, and percent herbicide absorbed was expressed as [dpm in combusted tissue/(dpm in combusted tissue + dpm in leaf washes)] × 100. The data of oxidized samples of each plant part were expressed as percentage of the total [¹⁴C]-glyphosate absorbed (treated leaf + root + rest of shoot) for translocation studies. In addition, treated whole plants were oven-dried (50 °C, 4 days), pressed against a 25 cm × 12.5 cm phosphor storage film during 12 h, and scanned for radiolabel dispersion using a storage phosphor system model Cyclone (Perkin-Elmer). The experiments were arranged in a completely randomized design with five replicates.

Metabolism Study. The protocol described by Rojano-Delgado et al.²⁷ was followed for the metabolism study. The concentration of glyphosate and its metabolites was determined by reversed-polarity capillary electrophoresis. Glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyoxylate, sarcosine, and formaldehyde were detected in leaf tissues of plants of all biotypes at 48, 96, and 168 HAT. Leaf tissues of treated and untreated plants were cut and frozen. Then, samples were washed, ground, mixed with acetone solution, submitted to ultrasound, centrifuged, dried under nitrogen flow, mixed with potassium phthalate, cetyl trimethylammonium bromide, and acrylonitrile, filtered, and then submitted to electrophoresis on equipment model G1600A (Agilent). Electropherograms were obtained, and the concentrations of glyphosate and its metabolites were determined on the basis of standard equations of Rojano-Delgado et al.²⁷ The experiments were arranged in a completely randomized design with three replicates.

EPSPS Gene Sequencing. Total RNA was extracted from 0.1 g of leaf tissue. Samples were collected from each plant, immediately frozen by immersion in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Total RNA was isolated using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions, and treated with TURBO DNase to eliminate any

DNA contamination. The resulting RNA was stored at -80°C . First-strand cDNA (cDNA) synthesis was carried out using $2\ \mu\text{g}$ of total RNA isolated previously and a M-MLV RT in combination with oligo(dT)_{12–18} and random nonamers, according to the manufacturer's instructions. Primers designed by Perez-Jones et al.²⁵ (sense, 5' AGCTGTAGTCGTTGGCTGTG 3'; antisense, 5' GCCAAGAAA-TAGCTCGCACT 3') were used to amplify a 564 bp fragment of the EPSPS gene from *D. insularis* R1, R2, and S biotypes. Each PCR was carried out in duplicate using the cDNA obtained from 50 ng of total RNA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 μM of each primer, 1 \times buffer, and 0.625 unit of a 100:1 enzyme mixture of nonproofreading and proofreading polymerases in a final volume of 25 μL . Cycling conditions were as follows: 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 35 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, and a final extension cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. An aliquot of the PCR product was loaded in a 1% agarose gel and the rest purified using ExoSAP-IT for PCR Product Clean-Up, following the manufacturer's instructions. The purified PCR products were sequenced by the sequencing service (SCAI) in the University of Córdoba. Three biological replicates from each R1, R2, and S biotype were used for RNA extraction and amplification of the EPSPS gene.

Statistical Analysis. Shikimic acid, absorption, translocation, and metabolism data were submitted to ANOVA and Tukey's HSD post hoc test at the 5% probability. ANOVA and Tukey's test were performed by using software Statistix version 8.0 (Analytical Software).

RESULTS AND DISCUSSION

Shikimic Acid Extraction. A factorial scheme with two factors, biotypes and evaluation times, was tested by ANOVA. Interaction between the studied factors was highly significant ($P < 0.001$). Shikimic acid did not accumulate in biotypes R1 and R2 after glyphosate application in the range of HAT tested (Table 1). The concentration of shikimic acid in the S biotype

Table 1. Shikimic Acid Accumulation in Leaves of Susceptible (S) and Resistant (R1 and R2) *D. insularis* Biotypes, at Different Hours after Treatment (HAT) with Glyphosate

biotype	HAT	shikimic acid ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight)
S	24	47.5 \pm 5.6 A
	48	54.7 \pm 6.5 A
	72	56.2 \pm 9.3 A
	96	197.3 \pm 47.7 B
	168	350.4 \pm 46.7 C
R1	24	42.1 \pm 2.8 A
	48	36.4 \pm 4.7 A
	72	50.5 \pm 4.9 A
	96	82.6 \pm 8.6 A
	168	69.9 \pm 4.8 A
R2	24	45.1 \pm 5.6 A
	48	54.5 \pm 3.7 A
	72	58.0 \pm 2.1 A
	96	59.5 \pm 3.9 A
	168	61.0 \pm 6.6 A

^aMeans within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey HSD test. Values \pm standard error of the mean.

was similar to that of the resistant biotypes up to 72 HAT. However, a strong accumulation of shikimic acid was observed in the S biotype after 72 HAT. At 168 HAT, 350.4, 69.9, and 61.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight of shikimic acid was detected in leaf tissues of biotypes S, R1, and R2, respectively; that is, biotype S

accumulated 5.0 and 5.7 times more shikimic acid than biotypes R1 and R2, respectively, at 168 HAT.

A high accumulation of shikimic acid in the S biotype indicated susceptibility to glyphosate. On the other hand, shikimic acid was found below the detection limit in biotypes R1 and R2, indicating low susceptibility to glyphosate. Elevated shikimic acid accumulation is used as an early and highly sensitive indicator of glyphosate effects on glyphosate-sensitive plant tissues. Changes in shikimic acid levels in plants are specifically the result of inhibition of EPSPS and have been used as a marker for EPSPS sensitivity in plants to glyphosate.²⁶ These results confirmed that biotypes R1 and R2 were glyphosate-resistant.

In the susceptible *D. insularis* plants, shikimic acid accumulation was slower as well as its concentration being lower than in other grass weeds studied, such as *L. multiflorum*^{18,25,28} and *L. rigidum*.²⁸ This fact indicates that the glyphosate absorption may be slower in this weed species, as the accumulation of shikimic acid is an indicator of whether glyphosate is reaching the target enzyme.²⁹

Absorption Study. A factorial scheme with two factors, biotypes and evaluation times, was tested by ANOVA. Interaction between the studied factors was significant ($P = 0.015$). The patterns of ¹⁴C-glyphosate absorption were different between the susceptible biotype and resistant ones (Table 2). At 12 HAT, <20% of glyphosate had absorbed by plants of the resistant biotypes, whereas approximately 36% was found in susceptible plants. However, there was no difference in absorption of ¹⁴C-glyphosate among the biotypes after 72 HAT. At 96 HAT, 48.4, 44.6, and 47.7% of the recovered radioactivity had been absorbed by plants of biotypes S, R1, and R2, respectively. The initial difference in herbicide absorption, between S and R1/R2, biotypes could play an important role for *D. insularis* resistant biotypes because differential metabolism was also verified, as discussed under Metabolism Study.

Herbicide absorption by plants was almost 50% in both susceptible and resistant biotypes (Table 2). In general, this result is in agreement with some resistant weeds,¹¹ but other distinct absorption results were reported for other studied grass weeds. Thus, susceptible and resistant biotypes of *L. multiflorum* from Chile absorbed >90% of ¹⁴C-glyphosate,³⁰ whereas biotypes from the United States had absorbed almost 60% at 48 HAT.³¹ At 72 HAT, a susceptible and two resistant biotypes (from Chile and the United States) of *L. multiflorum* absorbed <40% of radioactivity.²⁵ Thus, herbicide absorption could be dependent on biotype, growing conditions, and environmental plant adaptation.

Differences in glyphosate absorption were observed in *L. multiflorum* biotypes.^{30,31} Michitte et al.³² examined the involvement of the cuticle properties on the resistance and did not find evidence of wax crystallization in either susceptible or resistant biotypes, although certain zones on the surface of resistant biotype had wrinkles and the leaf cuticle was thicker than in the susceptible one. Differences in herbicide absorption between leaves with thicker and thinner cuticles were recently observed in *Abutilon theophrasti*, so that lower absorption of acifluorfen, a moderately polar herbicide, was observed in leaves of thicker epicuticular wax.³³ Thus, because glyphosate is a polar herbicide, lower absorption may occur in plants with thicker cuticles.³⁴

Differences in glyphosate absorption may be also related to distinct leaf epicuticular wax composition,³¹ as observed between glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *L.*

Table 2. Absorption (Percentage of Recovered Radioactivity) and Translocation (Percentage of Absorbed Radioactivity) of ^{14}C -Glyphosate in Susceptible (S) and Resistant (R1 and R2) *D. insularis* Biotypes, at Different Hours after Treatment (HAT) with ^{14}C -Glyphosate

biotype	HAT	absorption ^a	translocation ^a		
			treated leaf	root	rest of shoot
S	12	35.9 ± 1.4 AB	69.8 ± 3.1 D	15.7 ± 0.8 JKLMNO	14.5 ± 0.3 LMNO
	24	40.3 ± 3.2 AB	59.5 ± 1.0 E	20.6 ± 0.8 HIJKLM	20.9 ± 1.7 HIJKL
	48	41.1 ± 1.7 AB	56.8 ± 1.2 E	20.7 ± 0.9 HI	22.4 ± 1.3 HIJK
	72	47.7 ± 0.8 A	53.2 ± 2.0 E	21.4 ± 1.6 HIJK	25.4 ± 0.6 HIJ
	96	48.4 ± 1.6 A	41.9 ± 1.4 F	32.2 ± 1.4 G	25.8 ± 1.3 GH
R1	12	12.0 ± 0.9 D	82.3 ± 3.2 A	8.7 ± 0.6 O	9.0 ± 0.8 O
	24	16.8 ± 1.4 CD	82.0 ± 1.3 AB	8.3 ± 0.7 O	9.6 ± 0.7 O
	48	19.7 ± 2.9 CD	79.2 ± 1.6 ABC	11.7 ± 0.5 NO	9.1 ± 1.1 O
	72	37.3 ± 1.3 AB	75.9 ± 1.3 ABCD	12.3 ± 0.8 NO	11.8 ± 0.8 NO
	96	44.6 ± 3.0 A	74.5 ± 1.3 BCD	14.5 ± 0.2 LMNO	11.0 ± 1.1 NO
R2	12	19.4 ± 4.2 CD	75.4 ± 2.4 ABCD	11.1 ± 0.5 NO	13.5 ± 0.6 LMNO
	24	27.1 ± 3.9 BC	74.0 ± 0.4 CD	12.9 ± 0.8 MNO	13.1 ± 0.9 MNO
	48	27.9 ± 5.7 BC	71.7 ± 1.8 CD	14.5 ± 0.5 LMNO	13.7 ± 0.3 LMNO
	72	46.1 ± 4.0 A	69.5 ± 1.1 D	16.2 ± 1.0 KLMNO	14.3 ± 1.3 LMNO
	96	47.7 ± 3.8 A	69.0 ± 2.9 D	17.8 ± 1.2 IJKLMN	13.2 ± 0.4 NO

^aMeans within a column, for absorption studies, and within a column and/or line, for translocation studies, followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey HSD test. Values ± standard errors of the mean.

multiflorum.³⁴ Authors found up to 5% more alcohols and aldehydes (polar components) in resistant biotype, increasing slightly the leaf polarity. These results suggest that the nature of cuticle properties may play an important role in the absorption differences between biotypes S and R1 and R2 tested in this work.

Contact angle of droplets and foliar herbicide retention can also play an important role in glyphosate absorption.³⁰ However, according to previous studies, *D. insularis* biotypes showed similar contact angle and foliar retention,³ so that these characteristics did not influence glyphosate absorption in either susceptible or resistant biotypes.

Translocation Study. A factorial scheme with three factors, biotypes, plant parts, and evaluation times, was tested by ANOVA. Interaction between the studied factors was highly significant ($P < 0.001$). *D. insularis* biotypes also showed a distinct pattern of translocation of ^{14}C -glyphosate, according to the evaluation time (Table 2). This pattern was a little different even among the resistant biotypes. At 48 HAT, there was a clear difference in percentage of ^{14}C -glyphosate translocated from the treated leaf to the roots and the rest of the shoot in susceptible and resistant biotypes. At this time, 56.8, 79.2, and 71.7% of ^{14}C -glyphosate absorbed remained in the treated leaf for S, R1, and R2 biotypes, respectively. In addition, 20.7, 11.7, and 14.5% had been translocated to roots and 22.4, 9.1, and 13.7% had been translocated to the rest of the shoot in S, R1, and R2 biotypes, respectively.

According to Lorraine-Colwill et al.,²⁴ Wakelin et al.,¹⁶ Perez-Jones et al.,²⁵ and Yu et al.,²² more glyphosate remained in treated leaves and less glyphosate was translocated to young leaves in resistant biotypes compared to susceptible ones; in contrast, in the susceptible biotype, a greater percentage of glyphosate is moved to untreated leaves, roots, and the stem, as observed in this study. This different pattern confirms a distinct behavior of herbicide translocation in susceptible and resistant *D. insularis* biotypes. Differences in ^{14}C -glyphosate translocation were confirmed through phosphorimaging (Figure

1). These results indicate that herbicide translocation was found as a mechanism of resistant to glyphosate.

^{14}C -glyphosate was widely distributed among leaves, root, and the rest of the shoot with appreciable acropetal and/or basipetal herbicide translocation in the S biotypes at 48 HAT (Figure 1). On the other hand, a low translocation of ^{14}C -glyphosate from treated leaf to the rest of the shoot was observed in R1 and R2 biotypes. In addition, an acropetal herbicide translocation was verified in the resistant biotypes. Like in the other species studied so far,³⁵ glyphosate was ambimobile in *D. insularis* (Figure 1), as seen from radioactivity migrating to the tips of the treated leaves (translocation in the xylem) and out of the treated leaves (translocation in the phloem) as well.²⁵ This suggests that an altered symplast transport is responsible for a differential glyphosate translocation between susceptible and resistant biotypes.^{13,16,24} These authors discussed the existence of an altered cellular transport that would retain glyphosate in the apoplastic space, thus preventing its entry into the phloem tissues.

Altered glyphosate symplast transport has been associated with lack of translocation in weeds resistant to glyphosate, such as *Conyza* spp.,^{13–15} *L. multiflorum*,³⁰ and *L. rigidum*.^{24,29} An explanation for differences in glyphosate translocation was provided by Ge et al.,¹⁹ studying *C. canadensis* resistance to glyphosate. Glyphosate enters the cytoplasm of both resistant and susceptible plant variants at the same rate, but begins to occupy the vacuole in the resistant but not the susceptible biotype. Glyphosate in the cytoplasmic pool is available for translocation to sink tissues. However, glyphosate sequestered within the vacuole is effectively removed from the phloem-accessible pool of glyphosate. The resistance mechanism for resistant plants reflects an inherent ability³⁶ to sequester glyphosate in the vacuole, where, presumably, it stays indefinitely or is released slowly at a sublethal rate.

Metabolism Study. A factorial scheme with three factors, biotypes, compounds, and evaluation times, was tested by ANOVA. Interaction between the studied factors was highly

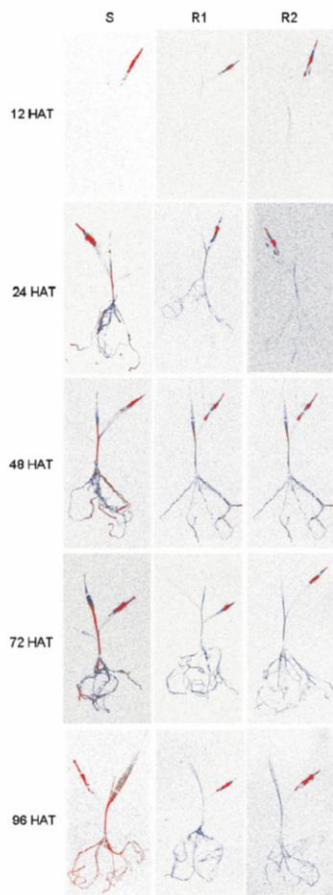


Figure 1. Phosphorimaging visualization of ^{14}C -glyphosate translocation in susceptible (S) and resistant (R1 and R2) *D. insularis* biotypes. HAT indicates hours after treatment. Intensity in red coloration shows greater ^{14}C -glyphosate concentrations.

significant ($P < 0.001$). Glyphosate decreased, whereas its metabolites increased, up to 168 HAT in the leaf tissues of both susceptible and resistant biotypes, but this event was much more intense in the resistant ones. More than 90% of glyphosate, in relation to its metabolites, was detected in the susceptible biotype up to 48 HAT, whereas 25.0 and 59.1% of glyphosate was observed in R1 and R2 biotypes, respectively. At 168 HAT, <10% of glyphosate was detected in the resistant biotypes, whereas about 80% of glyphosate was found in the susceptible biotype, in relation to its metabolites (Table 3).

In the susceptible biotype, AMPA and sarcosine were not detected up to 96 HAT, whereas almost 64 and 37% of AMPA and 15 and 32% of glyoxylate were found in R1 and R2 biotypes, respectively (Figure 2). In addition, sarcosine was also

Table 3. Relative Percentage of Glyphosate and Its Metabolites (AMPA + Glyoxylate + Sarcosine) in Susceptible (S) and Resistant (R1 and R2) *D. insularis* Biotypes, at Different Hours after Treatment (HAT) with Glyphosate

biotype	HAT	glyphosate ^a	metabolites ^a
S	48	92.0 \pm 3.0 AB	8.0 \pm 2.2 GH
	96	91.1 \pm 2.9 AB	8.9 \pm 0.5 GH
	168	80.2 \pm 6.5 C	10.8 \pm 0.5 F
R1	48	25.0 \pm 3.3 F	75.0 \pm 1.5 C
	96	10.0 \pm 3.7 G	90.0 \pm 5.9 B
	168	1.6 \pm 0.6 GH	98.4 \pm 1.2 A
R2	48	59.1 \pm 1.1 D	40.9 \pm 3.1 E
	96	23.7 \pm 1.1 F	76.3 \pm 2.1 C
	168	7.3 \pm 0.2 GH	92.7 \pm 3.9 AB

^aMeans within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey HSD test. Values \pm standard errors of the mean.

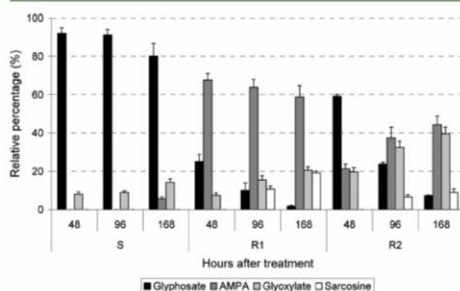


Figure 2. Relative percentage of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyoxylate, and sarcosine detected in leaves of susceptible (S) and resistant (R1 and R2) *D. insularis* biotypes, at different times after glyphosate application.

detected in the resistant biotypes. At 168 HAT, AMPA and glyoxylate were detected in the S biotype, indicating degradation of glyphosate, but, in the resistant biotypes, glyphosate was degraded to AMPA, glyoxylate, and sarcosine more rapidly than in the susceptible biotype. These results indicate that more rapid glyphosate degradation occurred in the resistant biotypes.

A difference in glyphosate degradation was also observed between the resistant biotypes. Glyphosate was more rapidly degraded in the R1 than in R2 biotype up to 168 HAT, when less glyphosate and more metabolites were detected in biotype R1 (Table 3 and Figure 2). This indicates that glyphosate metabolism in the R1 biotype was more intense than in biotype R2. The fact of increasing AMPA in the R2 biotype (Figure 2), whereas AMPA was decreased in the R1 biotype with time, supports this conclusion.

Two metabolic pathways were described for glyphosate degradation by soil microorganisms.^{12,37} In plants, a first degradation pathway involves the herbicide degradation by glyphosate dehydrogenase enzyme action, originating AMPA and glyoxylate.³⁷ AMPA is the main metabolite originated from glyphosate degradation, whereas glyoxylate, despite being a metabolite derived of glyphosate degradation, is also a plant

		* * * * *			
A. <i>thaliana</i>	GIFFASIDSKSDIELYLNAGTAMR	ELTAAVTAAGGNASYVLDGVPMRE	206		
S	GKPFVEKDAKEEVQLFLNAGTAMR	ELTAAVTAAGGNATYVLDGVPMRE			
R1	GKPFVEKDAKEEVQLFLNAGTAMR	ELTAAVTAAGGNATYVLDGVPMRE			
R2	GKPFVEKDAKEEVQLFLNAGTAMR	ELTAAVTAAGGNATYVLDGVPMRE			
		* * *			
A. <i>thaliana</i>	RPIGDLVVLGKQLGADVCTLGTC	PPVRYNANGGLPGGKVLGSGISSQ	256		
S	RPIGDLVVLGKQLGADVDFCLG	DCPPVRIKIGGLPGGKVLGSGISSQ			
R1	RPIGDLVVLGKQLGADVDFCLG	DCPPVRIKIGGLPGGKVLGSGISSQ			
R2	RPIGDLVVLGKQLGADVDFCLG	DCPPVRIKIGGLPGGKVLGSGISSQ			
		* * *			
A. <i>thaliana</i>	YLTALLMSAPLALGDVEIEI	VDKILISVPYVEMTLKLMERFGVSVHSDSW	306		
S	YLSALLMAAPLALGDVEIEI	IDKILISIPYVEMTLKLMERFGVKAHSDSW			
R1	YLSALLMAAPLALGDVEIEI	IDKILISIPYVEMTLKLMERFGVKAHSDSW			
R2	YLSALLMAAPLALGDVEIEI	IDKILISIPYVEMTLKLMERFGVKAHSDSW			
		** *			
A. <i>thaliana</i>	DRFFVKGQKQKYS	PKNAYVEGDAS	330		
S	DRFFYIKGGQKQKYS	PKNAYVEGDAS			
R1	DRFFCIKGGQKQKYS	PKNAYVEGDAS			
R2	DRFFCIKGGQKQKYS	PKNAYVEGDAS			

Figure 3. Partial protein sequence alignment of the EPSPS of S, R1, and R2 *D. insularis* biotypes. The highlighted color shows a proline (P) to threonine (T) and a tyrosine (Y) to cysteine (C) substitution at amino acids 182 and 310, respectively, in the resistant biotypes compared with the susceptible one (amino acid number based on the start codon (ATG) of *A. thaliana* [GenBank: CAA29828.1] EPSP sequence). An asterisk (*) indicates differences in the protein sequence between *A. thaliana* and *D. insularis* biotypes.

endogenous metabolite involved in different metabolic pathways.²⁷ AMPA is degraded to methylamine by C–P lyase enzyme action, and by methylamine dehydrogenase enzyme action, methylamine generates formaldehyde. A second pathway is glyphosate degradation to sarcosine by direct C–P lyase enzyme action.³⁷ Therefore, the appearance of these metabolites indicates that both pathways should be part of the metabolism of glyphosate in plants. Thus, the relative percentage of glyphosate and these metabolites can be used as an indicator of glyphosate metabolism in plants.²⁷

Glyphosate metabolism in plants is very limited. Although in some studies metabolism of glyphosate was demonstrated in plants, transformation products did not significantly reduce its phytotoxicity.^{38,39} The fact that glyphosate metabolism does not contribute to glyphosate resistance has been reported in *L. rigidum* from Australia,^{24,40} in *E. indica* from Malaysia,⁴¹ and in horseweed across the United States.¹³ Although evidence on the importance of glyphosate metabolism was not found as a mechanism of weed resistance,¹² according to the results of this study, we can affirm that the metabolism of this herbicide was found to play an important role in the resistance of *D. insularis* to glyphosate.

That differential metabolism associated with the initial difference in herbicide absorption, up to 48 HAT, allows us to affirm that a very low amount of glyphosate could attain its site of action in the resistant biotypes due to rapid herbicide degradation. This is not true for the susceptible biotype, because absorption was faster and degradation was very slower than for the resistant ones. In this case, metabolism also allows absorption to play an important role for glyphosate resistance in *D. insularis* at least up to 48 HAT.

EPSPS Gene Sequencing. A 522 bp fragment of the EPSPS gene from susceptible and resistant *D. insularis* biotypes was sequenced. The predicted protein sequences were searched using the BLASTp algorithm. Results showed a high similarity with *E. indica* EPSPS proteins, GenBank accessions AEB80423.2, AEB80422.2, and CAD01096.1, showing *E* values of 8e–122, 1e–121, and 2e–121, respectively. Protein alignment between *A. thaliana* (GenBank: CAA29828.1) and *D. insularis* biotypes (Figure 3) showed a high similarity in the sequences of 83.3%.

The comparison of cDNA sequences of the EPSPS between R1, R2, and S biotypes presented many silent mutations. However, in the predicted protein sequences, both resistant biotypes (R1 and R2) showed two amino acid changes in comparison to the S biotype. One nucleotide change (cytosine to adenine, not shown) in the first position of codon 182 (considering position 1 as the starting methionine (ATG codon) of the *A. thaliana* protein) resulted in a proline (S biotype) to threonine (R1 and R2 biotypes) amino acid substitution; in codon 310, one nucleotide change in the second position (adenine to guanine, not shown) resulted in a tyrosine (S biotype) to cysteine (R1 and R2 biotypes) substitution (Figure 3).

Changes in the EPSPS amino acid sequence have been demonstrated to confer glyphosate resistance. Those changes include the proline to serine, proline to threonine, proline to alanine, and proline to leucine substitutions at position 106.^{20–22,25,42–44} The proline to threonine amino acid change found at position 182 in our assays is consistent with that reported by Ng et al.²¹ and Wakelin and Preston;⁴² however, those authors reported this mutation at position 106 of the EPSPS protein instead of position 182 reported in this work. In vitro EPSPS assays will have to be conducted to determine the effect of the tyrosine to cysteine change found at position 310 to determine whether this mutation contributes to glyphosate resistance in *D. insularis* biotypes.

Summarizing, taken together, our results allow us to conclude that (1) shikimic acid does not accumulate in resistant biotypes after glyphosate application, whereas high accumulation occurs in the susceptible biotype, indicating the resistance of *D. insularis* to glyphosate; (2) initial herbicide absorption can play an important role as a mechanism of resistance up to 48 HAT, in association with metabolism, whereas a limited herbicide translocation plays a very important role as a mechanism of glyphosate resistance in *D. insularis*; (3) rapid degradation of glyphosate to AMPA, glyoxylate, and sarcosine indicates that herbicide metabolism plays an important role as a mechanism of glyphosate resistance in *D. insularis*; and (4) two amino acid changes at positions 182 and 310 in EPSPS, consisting of a proline to threonine and a tyrosine to cysteine substitution, respectively, in the resistant

biotypes, can contribute as a mechanism of glyphosate resistance in *D. insularis*.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +55 16 32039631. Fax: +55 16 32092620. E-mail: agrolbcarvalho@gmail.com.

Funding

This research was jointly supported by the Brazilian CNPq Sandwich Doctorate Scholarship of the first author and the MICINN (Spain) Project AGL2010-16774.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Stephen O. Duke for his suggestions and Pedro J. Christoffoleti for supplying seeds of the susceptible biotype.

REFERENCES

- (1) Duke, S. O.; Powles, S. B. Glyphosate: a once in a century herbicide. *Pest Manag. Sci.* **2008**, *64*, 319–325.
- (2) Duke, S. O.; Baerson, S. R.; Rimando, A. M. Herbicides: glyphosate. In *Encyclopedia of Agrochemicals*; Plimmer, J. R.; Gammon, D. W.; Ragsdale, N. N., Eds.; Wiley: New York, 2003; pp 708–869.
- (3) Carvalho, L. B.; Cruz-Hipólito, H. E.; González-Torralva, F.; Alves, P. L. C. A.; Christoffoleti, P. J.; De Prado, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. *Weed Sci.* **2011**, *59*, 171–176.
- (4) Powles, S. B.; Yu, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 317–347.
- (5) Heap, I. M. International Survey of Herbicide-Resistant Weeds, available at www.weedscience.org (accessed June 6, 2011).
- (6) Vargas, L.; Bianchi, M. A.; Rizzardi, M. A.; Agostinetto, D.; Dal Magro, T. *Conyza bonariensis* biotypes resistant to the glyphosate in southern Brazil. *Planta Daninha* **2007**, *25*, 573–578.
- (7) Lamego, F. P.; Vidal, R. A. Resistance to glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. *Planta Daninha* **2008**, *26*, 467–471.
- (8) Vidal, R. A.; Michelangelo, M. T.; De Prado, R.; Ruiz-Santaella, J. P.; Vila-Aiub, M. Glyphosate-resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. *Int. J. Food Agric. Environ.* **2007**, *5*, 265–269.
- (9) Roman, E. S.; Vargas, L.; Rizzardi, M. A.; Mattei, R. W. Resistance of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) to glyphosate. *Planta Daninha* **2004**, *22*, 301–306.
- (10) Vargas, L.; Roman, E. S.; Rizzardi, M. A.; Silva, V. C. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotypes in apple orchards. *Planta Daninha* **2004**, *22*, 617–622.
- (11) De Prado, J. L.; Osuna, M. D.; Heredia, A.; De Prado, R. *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2185–2191.
- (12) Duke, S. O. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5835–5841.
- (13) Feng, P. C. C.; Tran, M.; Chiu, T.; Sammons, R. D.; Heck, G. R.; Cajacob, C. A. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci.* **2004**, *52*, 498–505.
- (14) Koger, C. H.; Shaner, D. L.; Krutz, L. J.; Walker, T. W.; Buehring, N.; Henry, W. B.; Thomas, W. E.; Wilcut, J. W. Rice (*Oryza sativa*) response to drift rates of glyphosate. *Pest Manag. Sci.* **2005**, *61*, 1161–1167.
- (15) Dinelli, G.; Marotti, L.; Catiozone, P.; Bonetti, A.; Urbano, J. M.; Barnes, J. Physiological and molecular basis of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. biotypes from Spain. *Weed Res.* **2008**, *48*, 257–265.
- (16) Wakelin, A. M.; Lorraine-Colwill, D. F.; Preston, C. Glyphosate resistance in four different population of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Res.* **2004**, *44*, 453–459.
- (17) Perez, A.; Alister, C.; Kogan, M. Absorption, translocation and allocation of glyphosate in resistant and susceptible Chilean biotypes of *Lolium multiflorum*. *Weed Biol. Manag.* **2004**, *4*, 56–58.
- (18) Perez-Jones, A.; Park, K. W.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C.; Shaner, D. Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Sci.* **2005**, *53*, 775–779.
- (19) Ge, X.; D'Avignon, D. A.; Ackerman, J. J. H.; Sammons, R. D. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Manag. Sci.* **2010**, *66*, 345–348.
- (20) Baerson, S. R.; Rodriguez, D. J.; Tran, M.; Feng, Y.; Biest, N. A.; Dill, G. M. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.* **2002**, *129*, 1265–1275.
- (21) Ng, C. H.; Wickneswari, R.; Salmiah, S.; Teng, Y. T.; Ismail, B. S. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.* **2003**, *43*, 108–115.
- (22) Yu, Q.; Cairns, A.; Powles, S. B. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* **2007**, *225*, 499–513.
- (23) Gaines, T. A.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S. T.; Shaner, D. L.; Nissen, S. J.; Patzoldt, W. L.; Tranel, P. J.; Culpepper, A. S.; Grey, T. L.; Webster, T. M.; Vencill, W. K.; Sammons, R. D.; Jiang, J.; Preston, C.; Leach, J. E.; Westra, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *7*, 1029–1034.
- (24) Lorraine-Colwill, D. F.; Powles, S. B.; Hawkes, T. R.; Hollinshead, P. H.; Warner, S. A. J.; Preston, C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2003**, *74*, 62–72.
- (25) Perez-Jones, A.; Park, K. W.; Polge, N.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C. A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* **2007**, *226*, 395–404.
- (26) González-Torralva, F.; Cruz-Hipólito, H.; Bastida, F.; Müllerder, N.; Smeda, R. J.; De Prado, R. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4361–4366.
- (27) Rojano-Delgado, A. M.; Ruiz-Jiménez, J.; Castro, M. D. L.; De Prado, R. Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed-polarity CE with indirect absorptiometric detection. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1423–1430.
- (28) Ribeiro, D. N.; Gil, D.; Cruz-Hipólito, H. E.; Ruiz-Santaella, J. P.; Christoffoleti, P. J.; Vidal, R. A.; De Prado, R. Rapid assays for detection of glyphosate-resistant *Lolium* spp. *J. Plant Dis. Prot.* **2008**, *21*, 95–100.
- (29) Powles, S. B.; Preston, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technol.* **2006**, *20*, 282–289.
- (30) Michitte, P.; De Prado, R.; Espinoza, N.; Ruiz-Santaella, J. P.; Gaurvit, C. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Sci.* **2007**, *55*, 435–440.
- (31) Nandula, V. K.; Reddy, K. N.; Poston, D. H.; Rimando, A. M.; Duke, S. O. Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Sci.* **2008**, *56*, 344–349.
- (32) Michitte, P.; Gaurvit, C.; Heredia, A.; De Prado, R. Resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum*: involvement of epicuticular waxes? In *XII International Conference on Weed Biology*; Association Française de la Protection des Plantes: Dijon, France, 2004; pp 597–602.
- (33) Hatterman-Valenti, H.; Pitty, A.; Owen, M. Environmental effects on velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) epicuticular wax deposition and herbicide absorption. *Weed Sci.* **2011**, *59*, 14–21.
- (34) Guimarães, A. A.; Ferreira, E. A.; Vargas, L.; Silva, A. A.; Viana, R. G.; Demuner, A. J.; Conceição, G.; Aspiazu, L.; Galon, L.; Reis, M. R.; Silva, A. F. Chemical composition of the epicuticular wax of Italian ryegrass biotypes resistant and susceptible to glyphosate. *Planta Daninha* **2009**, *27*, 149–154.

- (35) Franz, J.; Mao, M. K.; Sikorski, J. A. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*; American Chemical Society: Washington, DC, 1997. 653 pp.
- (36) Zelaya, I. A.; Owen, M. D. K.; VanGessel, M. J. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Theor. Appl. Genet.* **2004**, *110*, 58–70.
- (37) Schuette, J. *Environmental Fate of Glyphosate*; DPR: Sacramento, CA, 1998; 13 pp.
- (38) Sandberg, C. L.; Meggitt, W. F.; Penner, D. Absorption, translocation and metabolism of ^{14}C -glyphosate in several weed species. *Weed Res.* **1980**, *20*, 195–200.
- (39) Simarmata, M.; Kaufmann, J. E.; Penner, D. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* **2003**, *51*, 678–682.
- (40) Feng, P. C. C.; Pratley, J. E.; Bohn, J. A. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci.* **1999**, *47*, 412–415.
- (41) Tran, M.; Baerson, S.; Brinker, R.; Casagrande, L.; Faletti, M.; Feng, Y.; Nemeth, M.; Reynolds, T.; Rodriguez, D.; Schafer, D. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. *Proceedings of the 17th Asia-Pacific Weed Science Society Conference*; APWSS: Philippines, 1999; pp527–536.
- (42) Wakelin, A. M.; Preston, C. A target-site is present in a glyphosate resistant *Lolium rigidum* (Gaud.) population. *Weed Res.* **2006**, *46*, 432–440.
- (43) Simarmata, M.; Penner, D. The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Sci.* **2008**, *56*, 181–188.
- (44) Kaundun, S. S.; Dale, R. P.; Zelaya, I. A.; Dinelli, G.; Marotti, I.; McIndoe, E.; Cairns, A. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3227–3233.

Target site mutation and reduced translocation are
present in a glyphosate-resistant *Lolium*
multiflorum Lam. biotype from Spain

González-Torralva, F., Gil-Humanes, J., Barro, F., Brants I. & De
Prado, R. (2012). *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 16-22.



Research article

Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from SpainFidel González-Torralva^{a,*}, Javier Gil-Humanes^b, Francisco Barro^b, Ivo Brants^c, Rafael De Prado^a^a Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain^b Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), E-14080 Córdoba, Spain^c Monsanto Europe SARL, Scientific Affairs, 1150 Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2012

Accepted 4 June 2012

Available online 17 June 2012

Keywords:

Lolium multiflorum Lam.

Glyphosate

EPSPS

Resistance mechanism

ABSTRACT

The resistance mechanism of a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype collected in Córdoba (Southern Spain) was examined. Resistance Factor values at three different growth stages ranged between 4.77 and 4.91. At 96 hours after treatment (HAT) the S biotype had accumulated seven times more shikimic acid than the R biotype. There were significant differences in translocation of ¹⁴C-glyphosate between biotypes, i.e. at 96 HAT, the R biotype accumulated in the treated leaf more than 70% of the absorbed herbicide, in comparison with 59.21% of the S biotype; the R biotype translocated only 14.79% of the absorbed ¹⁴C-glyphosate to roots, while in the S population this value was 24.79%. Visualization of ¹⁴C-glyphosate by phosphor imaging showed a reduced distribution in the R biotype compared with the S. Glyphosate metabolism was not involved in the resistance mechanism due to both biotypes showing similar values of glyphosate at 96 HAT. Comparison of the EPSPS gene sequences between biotypes indicated that the R biotype has a proline 182 to serine amino acid substitution. In short, the resistance mechanism of the *L. multiflorum* Lam. biotype is due to an impaired translocation of the herbicide and an altered target site.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Glyphosate has become the leading postemergence, systemic, nonselective, broad-spectrum herbicide for the control of annual and perennial weeds [1]. Today, the major uses of glyphosate in world agriculture are weed control in direct sowing (no-tillage), in transgenic crops, and in cover crops (orchards and vineyards) [2,3]. Glyphosate inhibits the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) (EC 2.5.19) [4]. The EPSPS is the vital and essential enzyme that catalyzes the conversion of shikimate 3-phosphate (S3P) and phosphoenolpyruvate (PEP) to EPSP [5]. This inhibition prevents the biosynthesis of the aromatic amino acids phenylalanine, tyrosine, and tryptophan that are required for protein synthesis [6]. Finally, inhibition of growth occurs almost immediately, followed by chlorosis at the newest growing points and necrosis throughout the entire plant within 1–2 weeks [1]. Repeated use has resulted in the selection of glyphosate resistance in 22 weed species in 19 different countries around the world [7]. *Lolium* spp. are major weeds of cereals and orchards in world agriculture, *Lolium rigidum* was first reported as being glyphosate

resistant in Australia [8], and, later, *Lolium multiflorum* resistant biotypes were reported from Chile, USA, Spain, and Brazil [9–13].

The major resistance mechanisms reported for glyphosate-resistant monocots are reduced glyphosate translocation [12,14–20] probably due to vacuolar sequestration [21], EPSPS point mutation (proline to serine/alanine/threonine/leucine) [16,17,19,22–25], EPSPS over-expression [26] and glyphosate metabolism [27].

The general objective of this research was to investigate the resistance mechanism involved in a glyphosate-resistant *L. multiflorum* Lam. (hereinafter *L. multiflorum*) population from Córdoba (Southern Spain) by examining the efficacy of glyphosate under greenhouse conditions at three different growth stages, determining the physical, physiological, biochemical and molecular basis that could explain the resistance.

2. Results and discussion

2.1. Dose-response assays

Dose-response assays showed similar resistance factors (RF = ED₅₀(R)/ED₅₀(S)) among the different growth stages for both S and R biotypes (Table 1). The 3–5 leaf stage was the most susceptible growth stage for both biotypes, although at a later

* Corresponding author. Tel./fax: +34 957 21 86 00.
E-mail address: z82gotof@uco.es (F. González-Torralva).

Table 1Parameters of the equation used to calculate the glyphosate dose required for 50% plant injury (ED₅₀) of *L. multiflorum* biotypes at three different growth stages.

Growth stage	Biotype	c	d	b	pseudo r ^{2b}	P ^c	ED ₅₀ (g ai ha ⁻¹)	R.F.
3–5 leaf	S	9.21	100.00	2.18	0.94	<0.0001	78.12 ± 0.9	–
	R	2.55	91.83	1.12	0.98	<0.0001	380.88 ± 1.1	4.88
Tillering	S	26.25	95.18	1.59	0.88	<0.0001	109.08 ± 12.8	–
	R	27.35	100.00	4.14	0.86	<0.0001	521.28 ± 16.3	4.77
Flowering	S	31.33	99.65	0.87	0.90	<0.0001	268.20 ± 51.1	–
	R	33.21	100.00	2.09	0.83	<0.0001	1317.24 ± 75.5	4.91

ED₅₀ mean values ± standard errors of the mean; R.F.: Resistance Factor (R.F. = ED₅₀(R)/ED₅₀(S)).

developmental growth the dose to inhibit the above ground biomass by 50% (ED₅₀) increased considerably. Thus, in the flowering stage, the ED₅₀ found for both biotypes was three times higher than the rate used to obtain the same mortality in the 3–5 leaf stage (Table 1). From those results we have concluded that the 3–5 leaf stage is the optimal one for controlling both populations. Resistance factors ranging from two to four times have been reported in *L. multiflorum* biotypes from USA and Chile [9,10,18]. However, assays carried out on a *L. rigidum* biotype resistant to glyphosate showed a higher level of resistance and was 11 times more resistant with respect to the susceptible population [33].

2.2. Spray retention and contact angle assays

Different studies have shown the importance of the spray retention and contact angle assays, because those measures can, in some cases, determine the herbicide efficacy and selectivity in different weed species. In *L. multiflorum* biotypes significant differences were detected in contact angle values measured in the abaxial surface suggesting that cuticle composition may play a role in the glyphosate resistance [12,34–37]. The R biotype retained more glyphosate solution than the S population; but there were no significant differences between biotypes. The values obtained were in the range of 1.3–1.5 mL g⁻¹ dry weight (Table 2). Our results are dissimilar to those reported by Ref. [12], who found significant differences between R and S biotypes of *L. multiflorum* from Chile. Species like *Ambrosia artemisiifolia*, *Triticum aestivum* L., *Pisum sativum* L., *Chamomilla recutita* L., *Solanum nigrum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. have shown different values in foliar retention ranging from 50 to 800 µL g⁻¹ dry weight [38]. The contact angle data ranged from 85 to 98°, and we did not find any significant differences between biotypes, although in the R biotype those angles were greater than in the S biotype. Contact angles ranging from 105 to 110° have been reported in adaxial surfaces without any significant differences between R and S *L. multiflorum* biotypes, but, significant differences in the abaxial surface were reported [12]. In four *Digitaria insularis* biotypes there were no significant differences in contact angles measured in the adaxial surface [37]. Our data suggest the similarity of leaf cuticle and pilosity in both biotypes (Table 2).

2.3. Shikimic acid accumulation

Enzyme EPSPS is the molecular site of action of the herbicide glyphosate, and the inhibition of this enzyme causes shikimic acid

accumulation [4]. Shikimic acid concentration in the R biotype was similar throughout the experiment. At 24 h after glyphosate treatment there were no significant differences between R and S biotypes, both of which presented similar amounts of shikimic acid; however, from this time on, both biotypes accumulated significantly different amounts of shikimic acid (Table 3). The susceptible biotype accumulated seven times more shikimic acid than the resistant population at 96 HAT. Shikimic acid accumulation confirms the resistance level found in the whole plant dose response assays. Similar results have been reported in *L. multiflorum* biotypes from Oregon and Mississippi, USA [10,18], where the maximum accumulation in both biotypes was reached at 96 h after treatment. In *L. multiflorum* from Chile treated at 720 ae ha⁻¹, the shikimic acid accumulation reached values of ~2 and 7 mg g⁻¹ fresh weight in R and S biotypes, respectively [12]. In a recent publication, shikimic acid accumulation on *D. insularis* plants was significantly different at 96 HAT, with smaller amounts of shikimic acid in resistant biotypes compared with the susceptible one [27].

2.4. Absorption and translocation of ¹⁴C-glyphosate

Maximum ¹⁴C-glyphosate absorption between R and S biotypes was reached at 96 HAT, both populations having absorbed comparable amounts of ¹⁴C-glyphosate throughout the experiment, and, at this time, more than 86% of the applied herbicide had been absorbed in both biotypes. According to the Tukey's test there were no significant differences in leaf absorption of ¹⁴C-glyphosate between R and S biotypes (Table 4). However, clear differences in translocation of ¹⁴C-glyphosate between R and S biotypes were observed (Table 5). For instance, at 24 HAT, similar amounts of ¹⁴C-glyphosate were found between biotypes in the treated leaf, rest of plant, and roots. At 48 and 72 HAT the amount of ¹⁴C-glyphosate in the treated leaf of S biotype was smaller than that of the R biotype with no significant differences. Both biotypes exhibited significant differences in the amount of ¹⁴C-glyphosate in treated leaf and roots at 96 HAT. The amount of ¹⁴C-glyphosate translocated from the treated leaf to the rest of plant and roots in the R biotype was less than 30%, in comparison; the S biotype translocated more than 40%. The R biotype showed a different translocation pattern retaining more ¹⁴C-glyphosate in the treated leaf and translocating smaller amounts to roots (Table 5). At 96 HAT, the ¹⁴C-glyphosate found in the rest of plant was not significant between biotypes according to the Tukey's test (Table 5).

Table 2Spray retention^a and contact angles^a of glyphosate solution for *L. multiflorum* biotypes treated in the 3–5 leaf stage.

Biotype	Spray retention mL g ⁻¹ dry weight	Contact angle (left) deg.	Contact angle (right) deg.
R	1.56 ± 0.3A	97.85 ± 1.5A	96.95 ± 3.8A
S	1.35 ± 0.1A	87.47 ± 0.9A	85.02 ± 2.1A

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey's test. Mean values ± standard errors of the mean.

Table 3Shikimic acid accumulation throughout the time in R and S plants of *L. multiflorum* after treatment at 200 g ai ha⁻¹.

Biotype	mg g ⁻¹ fresh weight ^a (hours after treatment)			
	24	48	72	96
R	0.20 ± 0.13A	0.19 ± 0.08B	0.21 ± 0.05B	0.25 ± 0.06B
S	0.18 ± 0.09A	0.68 ± 0.17A	1.45 ± 0.27A	1.82 ± 0.35A

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey's test. Mean values ± standard errors of the mean.

Table 4
Uptake (%) of ^{14}C -glyphosate in S and R *L. multiflorum* plants treated at the 3–5 leaf stage.

Biotype	^{14}C -glyphosate absorption (% of applied) ^a (hours after treatment)			
	24	48	72	96
S	23.8 ± 1.7D	40.2 ± 2.8C	64.4 ± 3.4B	86.3 ± 3.8A
R	24.1 ± 0.5D	38.6 ± 2.1C	62.8 ± 0.9B	86.9 ± 2.6A

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey's test. Mean values ± standard errors of the mean.

Quantitative results of translocation assays were corroborated qualitatively by using a phosphor imager system. There were visual differences in translocation of ^{14}C -glyphosate between R and S biotypes. At 96 HAT, smaller amounts of herbicide were observed in the root of the resistant biotype, but, on the contrary, the susceptible biotype showed little ^{14}C -glyphosate in the treated leaf and more accumulation in the root (Fig. 1). This visual difference was in accordance with the results found in translocation assays. Therefore, it is evident that the R biotype has a reduced glyphosate translocation to nontreated leaves and roots. At 96 h after glyphosate application, herbicide damage (chlorosis) began to appear in both treated and untreated leaves of the S biotype, while in the R plants only the herbicide application point was affected and the untreated leaves remained green (data not shown). The visual differences were in accordance with those results observed in shikimic acid accumulation and translocation in the *L. multiflorum* R and S biotypes.

Meristematic areas (shoot and root) are sensitive sites for glyphosate accumulation and action [20]. Thus, the efficacy in limiting herbicide translocation towards developing tissue could confer resistance in weeds. Differential amounts of glyphosate translocation have been reported in several glyphosate-resistant *Lolium* spp. [12,16]. Our results suggested a mechanism that reduces phloem glyphosate translocation to young tissues in the glyphosate-resistant biotype. Vacuolar sequestration has been proposed as being a potential mechanism for reduced glyphosate translocation in plants [39,40].

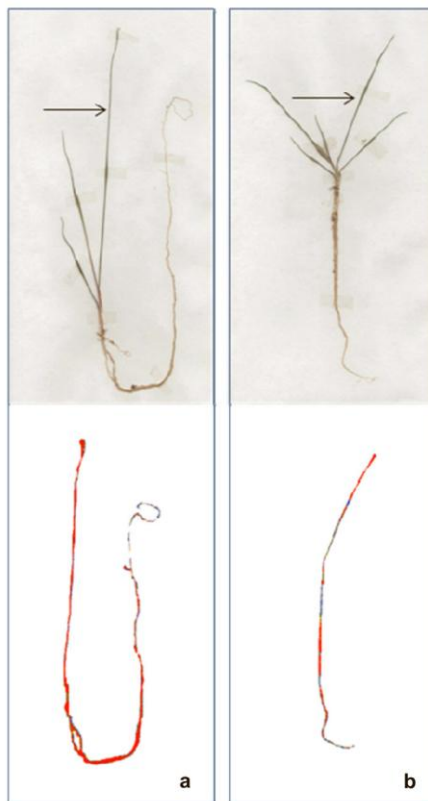
2.5. Metabolism assays

Table 6 shows the glyphosate metabolites at 96 HAT. There were significant differences in the amount of AMPA and glyoxylate between R and S biotypes. However, for the amount of glyphosate present in both biotypes the differences were not significant (Table 6; Fig. 2). These results suggest that the metabolism is not involved in the resistance of *L. multiflorum* biotypes (Table 6), as reported in other species like *L. rigidum* and *Conyza canadensis* from

Table 5
Translocation of ^{14}C -glyphosate in S and R *L. multiflorum* plants treated at the 3–5 leaf stage.

Biotype	HAT	Translocation (% of absorbed) ^a		
		Treated leaf	Rest of plant	Root
S	24	92.32 ± 1.21A	5.24 ± 2.93A	2.44 ± 1.49CD
	48	84.37 ± 3.31AB	9.16 ± 1.38A	6.47 ± 2.33C
	72	76.97 ± 1.38AB	12.68 ± 1.30A	10.35 ± 0.83BC
	96	59.21 ± 1.29C	16.09 ± 4.02A	24.70 ± 4.06A
R	24	94.79 ± 4.39A	3.00 ± 2.57A	2.21 ± 2.82CD
	48	88.62 ± 0.41AB	9.17 ± 1.57A	2.48 ± 1.31CD
	72	81.43 ± 3.28AB	9.61 ± 1.87A	8.97 ± 2.80C
	96	70.44 ± 1.03AB	14.77 ± 1.11A	14.79 ± 1.13B

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey's test. Mean values ± standard errors of the mean.

**Fig. 1.** Representative visualization of ^{14}C -glyphosate movement in the whole plant of susceptible (a) and resistant (b) *L. multiflorum* plants at 96 h after treatment. Intensity in red color shows greater concentration of ^{14}C -glyphosate. Initial treated leaf (top) is indicated by an arrow. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

USA and South Africa, in which the herbicide is not degraded, and, therefore, metabolism does not take any part in the resistance [14,25,41–43]. Our results disagree with those obtained in glyphosate resistant *D. insularis* biotypes, in which there was glyphosate

Table 6
Metabolism of glyphosate expressed as percentage of total glyphosate and its metabolites found at 96 HAT.

Biotype	Glyphosate ^a	AMPA ^a	Glyoxylate ^a
S	89.3 ± 1.4A	2.2 ± 0.4B	8.5 ± 1.9A
R	90.0 ± 2.5A	7.3 ± 3.1A	2.7 ± 0.3B

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level as determined by the Tukey's test. Mean values ± standard errors of the mean.

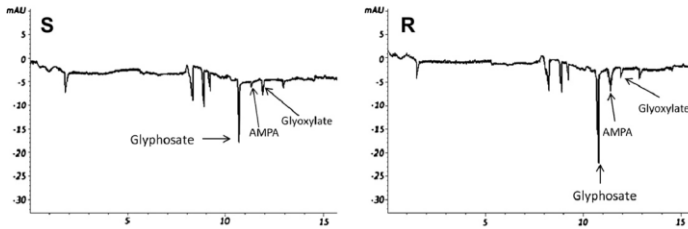


Fig. 2. Electropherogram obtained of S (left) and R (right) plants of *L. multiflorum* at 96 h after treatment with 200 g ai ha⁻¹. Plants were treated when reaching 3–5 leaves. Each metabolite found is indicated by an arrow.

degradation to AMPA, glyoxylate and sarcosine [27]. The glyphosate metabolism is very important in some tolerant weeds and has been demonstrated in species such as *Ipomoea purpurea*, *Convolvulus arvensis*, *Clitoria ternatea*, *Neonotonia wightii* and *Mucuna pruriens* var. *utilis*. All those species can degrade the herbicide glyphosate and produce large amounts of AMPA or sarcosine [43–47].

2.6. EPSPS gene sequencing

A 543 bp fragment of the EPSPS of S and R *L. multiflorum* plants was sequenced. The cDNA and its predicted proteins were searched using BLASTn and BLASTp algorithms. Results showed a high homology with *L. multiflorum* (GenBank: AAZ79230.2) and *L. rigidum* (GenBank: AAK20397.1). These sequences were aligned with an EPSPS protein sequence from *Arabidopsis thaliana* (GenBank: CAA29828.1) and *L. multiflorum* R and S biotypes showed a high similarity (83.4%), indicating that the EPSPS protein is highly similar (Fig. 3). cDNA sequence comparison of the EPSPS between R and S biotypes showed a mutation in the resistant biotype consisting of the presence of the codon AGC instead of the CCG of the S biotype. These nucleotide differences resulted in an amino acid change in the R biotype at position 182 consisting of a proline to serine substitution (considering position 1 as the starting methionine (ATG codon) of the *A. thaliana* protein). Our result is in agreement with previous works, in which this proline to serine substitution was found to confer a low level of glyphosate resistance in other

grass weeds around the world [16,22,25,48]. However, in these papers, this amino acid change was described at position 106 of the EPSPS protein instead of the position 182 reported here.

In short, this study investigated the glyphosate resistance mechanisms in the first confirmed case of *L. multiflorum* resistant to glyphosate reported in Europe (Spain). We showed that the reduced translocation of the herbicide (probably due to vacuolar sequestration) and an altered EPSPS protein are the main mechanisms of resistance.

3. Material and methods

3.1. Herbicides

¹⁴C-glyphosate (specific activity, 273.8 MBq mmol⁻¹, 95% radiochemical purity) was provided by American Radiolabeled Chemicals, Inc. (Saint Louis, MO, USA). A commercial formulation (Roundup Energy 45% w/w SL as isopropylamine salt) of this herbicide was supplied by Monsanto Agriculture (Spain), and used for all *in vivo* and *in vitro* assays.

3.2. Plant material and growing conditions

Glyphosate-resistant and susceptible biotypes of *L. multiflorum* were used in the experiments described below. Seeds were collected in 2006 from orchards in southern Spain. Resistant *L. multiflorum* was collected from an olive tree field in Córdoba

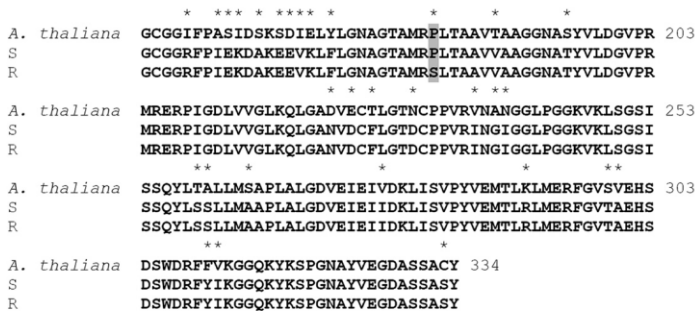


Fig. 3. Partial protein sequence alignment of the EPSP synthase of S and R *L. multiflorum* biotypes. The highlighted color shows a proline (P) to serine (S) substitution at amino acid 182 (amino acid number based on the start codon (ATG) of *A. thaliana* [GenBank: CAA29828.1] EPSP sequence). (*) indicates differences in the protein sequence between *L. multiflorum* biotypes and *A. thaliana* sequence.

treated at least for 10 years with glyphosate (2 kg ai ha⁻¹ of Roundup 36% w/v), hereafter referred to as R biotype. Seeds of susceptible *L. multiflorum* were collected from orchards never treated with herbicides and this is hereafter referred to as S biotype. The seeds were germinated in Petri dishes with moistened filter paper. Seedlings were planted in pots (one plant per pot) containing a peat:sandy loam potting mixture (1:1 v/v) and placed in a growth chamber at 28/18 °C (day/night), 16 h photoperiod, 850 μmol m⁻² s⁻¹ photosynthetic photon-flux density, and 80% relative humidity.

3.3. Dose-response assays

Glyphosate was applied to plants at three developmental growth stages: 3–5 leaf, tillering and flowering, using a laboratory spray chamber at a height of 50 cm above the plants. Herbicide solutions were applied with flat fan nozzles (Tee Jet 8002 EVS) at 200 kPa and an output volume equivalent to 200 L ha⁻¹. Rates ranged from 0 to 1000 g ai ha⁻¹. Treatments were replicated five times in a completely randomized design (each replication with three plants). To evaluate herbicide efficacy, at 21 days after treatment plants were cut at ground level and their fresh weight recorded and expressed as a percentage of untreated control plants. The same procedure was performed in the additional two growth stages.

3.4. Spray retention

Plants of *L. multiflorum* at the 3–5 leaf stage were sprayed with a colored glyphosate solution using the spray chamber described above. Treatment solution contained glyphosate at 200 g ai ha⁻¹ and 100 mg L⁻¹ Na-fluorescein [12,28]. After the spray had dried on the foliage, plants were cut off at ground level and immersed for 30 s in 50 mL of 5 mM NaOH. Readings were made with a Hitachi F-2500 Fluorescence Spectrophotometer at 490/510 nm. Plants were then placed at 60 °C for 72 h and the dry matter weighed. The experiment was arranged in a completely randomized design with four replications (3 plants each) for each biotype.

3.5. Contact angle

The third leaf of each *L. multiflorum* biotype at the 3–5 leaf stage was cut off and placed on a horizontal surface. Each leaf was treated with one 1 μL droplet containing glyphosate corresponding to 200 g ai in a volume of 200 L ha⁻¹. Droplets were applied in the center of the adaxial surface. The droplet deposition pattern was observed in a horizontal microscope (Leica MZ6 1.8X-4X). Images were captured with a camera [Leica Digilux 4.3 (1:2.8-4.5/8.3–24.9 mm) + Supermacro Leica Digimacro 4.3] adapted to one of the oculars of the microscope. The contact angle was obtained by means of shoot analysis using the ImageJ program following the methodology of Ref. [29]. The experiment was arranged in a completely randomized design with four replications (three plants each) for each *L. multiflorum* biotype.

3.6. Shikimic acid accumulation

L. multiflorum biotypes at the 3–5 leaf stage were treated with glyphosate (200 g ai applied in 200 L ha⁻¹) using a laboratory spray chamber as described before. A fifty mg mixture sample of treated and untreated plant tissue from each biotype was placed in vials containing 1 mL 0.25 N HCl and frozen in liquid nitrogen at 24, 48, 72 and 96 HAT. Shikimic acid accumulation was spectrophotometrically determined using a Beckman DU-640 spectrophotometer at 380 nm following the methodology described in Ref. [30]. The standard curve was determined by using the untreated plant

samples and increasing concentrations of shikimic acid. Results were expressed in mg per g fresh weight. The experiment was arranged in a completely randomized design with three treated replications (three plants each) and three untreated replications (three plants each) to use as blanks per biotype.

3.7. Absorption and translocation of ¹⁴C-glyphosate

¹⁴C-glyphosate was mixed with commercially formulated glyphosate to prepare a solution with a specific activity of 0.417 kBq μL⁻¹ (both absorption and translocation experiments) and a glyphosate concentration of 1 g ai L⁻¹ (200 g ai ha⁻¹ in 200 L). The labeled herbicide was applied in two droplets of 0.5 μL on the adaxial surface of the third leaf in each plant using a micropipette (LabMate + HTL). At 24, 48, 72 and 96 h after droplet deposition, the treated leaf was washed with 3 mL of a water–acetone (1:1 v/v) solution to remove unabsorbed ¹⁴C-glyphosate, then the plants were separated into treated leaf, rest of the shoot, and root. The rinsate was mixed with 7 mL of scintillation liquid and analyzed by liquid scintillation spectrometry (LSS) (Scintillation Counter, Beckman LS 6500). Plant tissue was dried at 60 °C over 72 h and combusted in a biological sample oxidizer, Packard Tri Carb 307. The ¹⁴CO₂ evolved was trapped and counted in 18 mL of a mixture of Carbo-Sorb E and Permafluor (9:9 v/v) (Perkin–Elmer, Shelton, CT, USA). Radioactivity was quantified by LSS and the herbicide absorbed was expressed as the percentage in kBq in combusted tissue divided by kBq into combusted tissue + kBq in leaf washes. The experiment consisted of three replications per harvest time and biotype, arranged in a completely randomized design.

3.8. Phosphor imaging

Visualization of herbicide translocation was performed using a phosphor imager (Perkin–Elmer, Packard Bioscience BV). Plants were treated with respective unlabeled and radiolabeled glyphosate as described for absorption and translocation experiments. Whole plants were gently rinsed, pressed and dried; then plants were placed adjacent to a 25 × 12.5 cm phosphor storage film for 6 h, and then scanned for radiolabel dispersion. The assay consisted of three replicates per harvest time and biotype arranged in a completely randomized design.

3.9. Metabolism study

Plants of both biotypes at the 3–5 leaf stage were treated with a glyphosate rate of 200 g ai ha⁻¹ as described in the dose–response assays section, and other untreated plants were used as controls. At 96 HAT, following the methodology described by Ref. [31], glyphosate and its metabolites i.e. aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyoxylate, sarcosine and formaldehyde were determined by reversed-polarity capillary electrophoresis using a 3D Capillary Electrophoresis Agilent G1600A instrument equipped with a diode array detector (DAD, wavelength range 190–600 nm). Glyphosate and AMPA supplied by Supelco (Bellefonte, USA); sarcosine, formaldehyde and glyoxylate obtained from Sigma–Aldrich (Saint Louis, MO, USA) were used as standards. Leaf tissues were washed with distilled water, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at –40 °C until use. The aqueous background electrolyte (BGE) consisted of 10 mM potassium phthalate, 0.5 mM hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and 10% acetonitrile at pH 7.5. The calibration equations were established from untreated plants, and known concentrations of glyphosate and its metabolites, which were determined from their peak areas in the electropherogram. The average value of the content of glyoxylate naturally produced by the plant was

subtracted from the average of the content of each biotype according to Ref. [32]. The experiment was arranged in a completely randomized design with four replications per biotype.

4. EPSPS gene sequencing

Total RNA was extracted from 0.1 g of leaf tissue. Samples were collected from each plant, immediately frozen by immersion in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and treated with TURBO DNase (RNase-Free; Ambion, Warrington, UK) to eliminate any DNA contamination. The resulting RNA was stored at -80°C . First strand complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using 2 μg of total RNA isolated previously and a Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in combination with oligo (dT)_{12–18} and random nonamers (Amersham Biosciences, Amersham, UK) according to the manufacturer's instructions. Primers previously designed in Ref. [16] (sense: 5' AGCTGTAGTCGTGCTGTG 3'; antisense: 5' GCCAAGCAATAGCTCCGACT 3'), were used to amplify a 564 bp fragment of the EPSP gene containing the mutation site described to confer resistance to glyphosate in *Lolium* spp. [19]. Each PCR was carried out in duplicate using the cDNA obtained from 50 ng of total RNA, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP, 0.2 μM of each primer, 1 \times buffer and 0.625 units of a 100:1 enzyme mixture of non-proofreading (*Thermus thermophilus*) and proofreading (*Pycococcus furiosus*) polymerases (BIOTOOLS, Madrid, Spain) in a final volume of 25 μL . Cycling conditions were: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 35 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s and 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; and a final extension cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. An aliquot of the PCR product was loaded in a 1% agarose gel and the rest was purified using ExoSAP-IT[®] for PCR Product Clean-Up (USB, Ohio, USA) following the manufacturer's instructions. The purified PCR products were sequenced by the STAB VIDA (Caparica, Portugal) DNA sequencing service. Five biological samples were used per biotype.

5. Statistical analyses

Dose response curves were determined for each biotype according to González-Torralva et al. [29]. Data were pooled and fitted to a nonlinear, log-logistic regression model:

$$Y = c + \left\{ (d - c) / [1 + (x/g)^b] \right\}$$

where Y is the fresh above-ground weight expressed as a percentage of the untreated control, c and d are coefficients corresponding to the lower and upper asymptotes, b is the slope of the line, g is the herbicide rate at the point of inflection halfway between the upper and lower asymptotes, and x (independent variable) is the herbicide dose. Regression analysis was conducted using Sigma Plot 10.0 statistical software.

Statistical analyses between the R and S L. *multiflorum* biotypes were performed using Statistix version 8.0 Analytical Software. The experimental results were subjected to analysis of variance and means were compared using Tukey's honestly significant difference (HSD) test at the 5% probability level.

Acknowledgments

The authors are grateful to Rafael Roldán-Gómez and Isabel M. Algaba García for their technical assistance during the conducting of this research. This research was funded by the firm Monsanto and by Spain's MICINN (Project AGL2010-16774). Javier Gil-Humanes acknowledges financial support from the I3P Program

from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas, which is co-financed by the European Social Fund.

References

- [1] S.O. Duke, S.B. Powles, Glyphosate: a once in a century herbicide, *Pest Manag. Sci.* 64 (2008) 319–325.
- [2] H. Cruz-Hipólito, M.D. Osuna, A. Heredia, J.P. Ruiz-Santaella, R. De Prado, Nontarget mechanism involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4844–4848.
- [3] S.O. Duke, Comparing conventional and biotechnology-based pest management, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5793–5798.
- [4] H.C. Steinrücken, N. Amrhein, The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94 (1980) 1207–1212.
- [5] D.R. Geiger, M.A. Fuchs, Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate), in: P. Böger, K. Wakabayashi, K. Hirai (Eds.), *Herbicide Classes in Development*, Springer-Verlag, Berlin, 2002, pp. 59–85.
- [6] E.G. Jaworski, Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis, *J. Agric. Food Chem.* 20 (1972) 1195–1198.
- [7] I. Heap, The International Survey of Herbicide Resistant Weeds, in: www.weedscience.com, accessed on 19.03.12.
- [8] S.B. Powles, D.F. Lorraine-Colwill, J.J. Dellow, C. Preston, Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia, *Weed Sci.* 46 (1998) 604–607.
- [9] A. Perez, M. Kogan, Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards, *Weed Res.* 43 (2003) 12–19.
- [10] A. Perez-Jones, K.W. Park, J. Colquhoun, C.A. Mallory-Smith, D. Shaner, Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon, *Weed Sci.* 53 (2005) 775–779.
- [11] H.E. Cruz-Hipólito, M.A. Diaz, J.P. Ruiz-Santaella, R. De Prado, J. Menéndez, R. Vidal, Glyphosate resistance in several populations of *Lolium* spp. from Spain, in: Forty-Seventh Meeting of Weed Science Society of America (2007), San Antonio, Texas.
- [12] P. Michitte, R. De Prado, N. Espinoza, J.P. Ruiz-Santaella, C. Gauvrit, Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile, *Weed Sci.* 55 (2007) 435–440.
- [13] D.N. Ribeiro, D. Gil, H.E. Cruz-Hipólito, J.P. Ruiz-Santaella, P.J. Christoffoleti, R. Vidal, R. De Prado, Rapid assays for detection of glyphosate-resistant *Lolium* spp., *J. Plant Dis. Prot.* 21 (2008) 95–99.
- [14] D.F. Lorraine-Colwill, S.B. Powles, T.R. Hawkes, P.H. Hollinshead, S.A.J. Warner, C. Preston, Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*, *Pest Biochem. Physiol.* 74 (2002) 62–72.
- [15] A.M. Wakelin, D.F. Lorraine-Colwill, C. Preston, Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones, *Weed Res.* 44 (2004) 453–459.
- [16] A. Perez-Jones, K.W. Park, N. Polge, J. Colquhoun, C.A. Mallory-Smith, Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*, *Planta* 226 (2007) 395–404.
- [17] Q. Yu, A. Cairns, S. Powles, Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype, *Planta* 225 (2007) 499–513.
- [18] V.K. Nandula, K.N. Reddy, D.H. Poston, A.M. Rimando, S.O. Duke, Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi, *Weed Sci.* 56 (2008) 344–349.
- [19] C. Preston, A.M. Wakelin, F.C. Dolman, Y. Bostamam, P. Boutsalis, A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management, *Weed Sci.* 57 (2009) 435–441.
- [20] Q. Yu, I. Abdallah, H. Han, M. Owen, S. Powles, Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*, *Planta* 230 (2009) 713–723.
- [21] X. Ge, D.A. d'Avignon, J.J.H. Ackerman, A. Collavo, M. Sattin, E.L. Ostrander, E.L. Hall, R.D. Sammons, C. Preston, Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: a ^{31}P NMR investigation, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 1243–1250.
- [22] A.M. Wakelin, C. Preston, A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population, *Weed Res.* 46 (2006) 432–440.
- [23] M. Jasieniuk, R. Ahmad, A.M. Sherwood, J.L. Firestone, A. Perez-Jones, W.T. Lanini, C. Mallory-Smith, Z. Stednick, Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme, *Weed Sci.* 56 (2008) 496–502.
- [24] M. Simarmata, D. Penner, The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California, *Weed Sci.* 56 (2008) 181–188.
- [25] S.S. Kaundun, R.P. Dale, I.A. Zelaya, G. Dinelli, I. Marotti, E. McIndoe, A. Cairns, A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 3227–3233.
- [26] S.R. Baerson, D.J. Rodriguez, M. Tran, Y. Feng, N.A. Bies, G.M. Dill, Glyphosate-resistant geograsses: identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, *Plant Physiol.* 129 (2002) 1265–1275.

- [27] L.B. De Carvalho, P.L.D.C.A. Alves, F. González-Torralva, H.E. Cruz-Hipolito, A.M. Rojano-Delgado, R. De Prado, J. Gil-Humanes, F. Barro, M.D. Luque De Castro, Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 615–622.
- [28] M. Grangeot, B. Chauvel, C. Gauvrit, Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*, *Weed Res.* 46 (2006) 152–162.
- [29] F. González-Torralva, H. Cruz-Hipolito, F. Bastida, N. Mülleder, R.J. Smeda, R. De Prado, Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4361–4366.
- [30] B.J. Singh, D.L. Shaner, Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate resistant plants, *Weed Technol.* 12 (1998) 527–530.
- [31] A.M. Rojano-Delgado, J. Ruiz-Jimenez, M.D. Luque de Castro, R. De Prado, Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed-polarity CE with indirect absorptiometric detection, *Electrophoresis* 31 (2010a) 1423–1430.
- [32] A.M. Rojano-Delgado, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, R. De Prado, Screening and confirmatory analysis of glyoxylate: a biomarker of plants resistance against herbicides, *Talanta* 82 (2010b) 1757–1762.
- [33] M.J. Owen, S.B. Powles, Glyphosate-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations in the Western Australian grain belt, *Weed Technol.* 24 (2010) 44–49.
- [34] D. Chachalis, K.N. Reddy, C.D. Elmore, M.L. Steele, Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among *Ipomoea* species and smallflower morningglory, *Weed Sci.* 49 (2001) 628–634.
- [35] J.K. Norsworthy, N.R. Burgos, L.R. Oliver, Differences in weed tolerance to glyphosate involved different mechanisms, *Weed Technol.* 15 (2001) 725–731.
- [36] M. Kogan, A. Perez, Herbicidas. Fundamentos Fisiológicos y Bioquímicos del Modo de Acción, EUCC/VCE, Chile, 2003.
- [37] L.B. de Carvalho, H.E. Cruz-Hipolito, F. Gonzalez-Torralva, P.L.C.A. Alves, P.J. Christoffoleti, R. De Prado, Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil, *Weed Sci.* 59 (2011) 171–176.
- [38] H. De Ruiter, A.J.M. Uffing, E. Meinen, A. Prins, Influence of surfactants and plant species on leaf retention of spray solutions, *Weed Sci.* 38 (1990) 567–572.
- [39] X. Ge, D.A. d'Avignon, J.J.H. Ackerman, R.D. Sammons, Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism, *Pest Manag. Sci.* 66 (2010) 345–348.
- [40] X. Ge, D.A. d'Avignon, J.J. Ackerman, B. Duncan, M.B. Spaur, R.D. Sammons, Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ^{31}P NMR, *Pest Manag. Sci.* 67 (2011) 1215–1221.
- [41] P.C.C. Feng, M. Tran, T. Chiu, R.D. Sammons, G.R. Heck, C.A. Cjacob, Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism, *Weed Sci.* 52 (2004) 498–505.
- [42] G. Dinelli, I. Marotti, A. Bonetti, M. Minelli, P. Catizone, J. Barnes, Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Biotypes, *Pestic. Biochem. Physiol.* 86 (2006) 30–41.
- [43] S.O. Duke, Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5835–5841.
- [44] P. Sprankle, C.L. Sandberg, W.F. Meggitt, D. Penner, Separation of glyphosate and possible metabolites by thin-layer chromatography, *Weed Sci.* 26 (1978) 673–674.
- [45] C.L. Sandberg, W.F. Meggitt, D. Penner, Absorption, translocation and metabolism of ^{14}C -glyphosate in several weeds species, *Weed Res.* 20 (1980) 195–200.
- [46] H. Cruz-Hipolito, A. Rojano-Delgado, J.A. Domínguez-Valenzuela, A. Heredia, M.D. Luque de Castro, R. De Prado, Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide, *Plant Soil* 347 (2011) 221–230.
- [47] A.M. Rojano-Delgado, H. Cruz-Hipolito, R. De Prado, M.D. Luque de Castro, A.R. Franco, Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. *utilis* plants, *Phytochemistry* 73 (2012) 34–41.
- [48] S.S. Kaundun, I.A. Zelaya, R.P. Dale, A.J. Lycett, P. Carter, K.R. Sharples, E. McIndoe, Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines, *Weed Sci.* 56 (2008) 637–646.

Two non-target mechanisms are involved in
glyphosate resistant horseweed (*Conyza*
canadensis L. Cronq.) biotypes

González-Torralva, F., Rojano-Delgado, A.M., Luque de Castro,
M.D., Mülleder, N. & De Prado, R. (2012). *Journal of Plant*
Physiology DOI: 10.1016/j.jplph.2012.06.014.

Response of *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* and *Conyza sumatrensis* to glufosinate

González-Torralva, F., Ríos-Gómez, J., Cruz-Hipolito, H.E. & De Prado, R. (2012). *Communications in Plant Sciences* 2: 1-4.

Response of *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* and *Conyza sumatrensis* to glufosinate

Fidel González-Torralva^{1*}, Julia Ríos-Gómez², Hugo Enrique Cruz-Hipólito³ and Rafael De Prado⁴

¹Post-graduate student at University of Córdoba, Spain, z82gotof@uco.es. ²Graduate student at University of Córdoba, Spain, a42rigoj@uco.es. ³Technical representative at Bayer, Mexico, cruzhipolito@yahoo.com.mx. ⁴Professor at University of Córdoba, Spain, qe1pramr@uco.es.

*Author for correspondence

Conyza bonariensis, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* are problematic weeds in citrus orchards and olive trees in southern Spain. The aim of this work was to determine the efficacy of glufosinate in these species, and also to establish a suitable growing stage for application in *C. bonariensis*. For this purpose, dose-response and spray retention assays were carried out in susceptible biotypes of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* at the rosette stage (BBCH 14-15). Additionally, the ED₅₀ and spray retention at two later growth stages were determined in *C. bonariensis*. Results at rosette stage (BBCH 14-15) showed an ED₅₀ of 0.216 in the case of *C. bonariensis*; 0.058 for *C. canadensis* and 0.090 L ha⁻¹ for *C. sumatrensis*. The spray retention values did not show any significant differences between the three species at rosette stage. In *C. bonariensis*, at the second stage of its growth (10-15 cm in height), the ED₅₀ obtained was 0.517 and 1.297 L ha⁻¹ for the third stage (with formed capitula). Also, the spray retention in the second and third stage was of 0.44 and 0.38 mL of glufosinate g⁻¹ of dry weight, respectively. These species treated in an early developmental stage are more susceptible to glufosinate herbicide.

Keywords: *Conyza* spp., dose-response, spray retention, DL-phosphinothricin.

Introduction

The genus *Conyza* Less (Asteraceae) is a native of North and South America. Different species of this genus were introduced in Europe, and, currently, due to its rapid adaptation and prolific seed production they are considered to be noxious weeds in more than 40 crops in 70 countries (Thébaud and Abbot 1995, Holm et al. 1997). In Spain, six species in different Spanish crops have been described, but only three of them are the most important, mainly affecting permanent crops such as citrus orchards and olive groves: hairy fleabane [*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.], horseweed [*Conyza canadensis* (L.) Cronq.], and tall fleabane [*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker = *Conyza albida* Willd. ex Spreng.] (Saavedra and Pastor 2002, Carretero 2004, Bastida et al. 2005). For all three species, seedling emergence is preferably in winter (Recasens and Conesa 2009) with flowering and seed production in summer-autumn (Carretero 2004).

The common way to control these problematic weeds is with the use of different non selective herbicides such as glufosinate. Glufosinate [2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoic acid] belongs to the glutamine synthetase inhibitors. It is used as a non-selective post-emergence herbicide and it controls a broad spectrum of annual and perennial grass and broadleaf weeds (Senseman 2007). Glufosinate works by inhibiting the glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) enzyme, which is very important in the nitrogen metabolism (Bayer et al. 1972, Lea et al. 1984, Wendler et al. 1990, Devine et al. 1993). After the herbicide application, a deficiency of glutamine occurs (Tachibana et al. 1986a) and an inhibition of photosynthesis, so, therefore, a rapid accumulation of ammonia is produced by the plant. The final result is the death of the plant cells (Bayer et al. 1972,

Tachibana et al. 1986a and 1986b, Coetzer and Al-Khatib 2001, Eubank et al. 2008).

Many investigations have shown the differential susceptibility/response among weed species, in the same genus, or even in crop cultivars when they are treated with a same or different herbicide(s). Those differences are very important when the chemical control is carried out because it could determine the application timing and the herbicide rate to be used (Carvalho et al. 2006, Ruiz-Santaella et al. 2006, Campos et al. 2009, Ferreira et al. 2010, Bond and Walker, 2011). We hypothesized that these species naturally exhibit different responses to glufosinate.

The objectives of this research were a) to determine under greenhouse conditions the response of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* to glufosinate; b) to evaluate the efficacy of glufosinate under greenhouse conditions at two additional growth stages on *C. bonariensis*; c) to characterize spray retention as a physical factor that could explain differential susceptibility to glufosinate in *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis*.

Material and methods

Plant material and growing conditions. Glufosinate-susceptible biotypes of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* were used in the experiments described below. Seeds were collected in 2006 from orchards in southern Spain and kept in paper bags at room temperature until their use. *C. bonariensis* and *C. canadensis* were collected from olive orchards in Córdoba, while *C. sumatrensis* was collected from citrus orchards in Huelva. In none of the cases had glufosinate ever been applied to control these weeds. The seeds were sown in 663 cm³ pots filled with moistened peat and were covered with transparent film

until the seeds germinated. Seedlings were planted in pots (one plant per pot) containing a 1:1 (v/v) peat:sand mix and placed in a growth chamber at 28/18 °C (day/night), 16 h photoperiod, 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux density, 80% relative humidity, and watered as required (González-Torralva et al. 2010).

Dose-response assays. Glufosinate was applied to plants at the BBCH 14-15 scale (Hess et al. 1997) using a laboratory spray chamber at a height of 50 cm above the plants. Herbicide solution doses were applied with flat fan nozzles (Tee Jet 8002 EVS) at 200 kPa and an output volume equivalent to 300 L ha^{-1} . Doses ranged from 0 to 0.4 L (formulated product) ha^{-1} . Additionally, in *C. bonariensis* a species with a rapid growth compared with the other two species, glufosinate was applied at two later growth stages: 10-15 cm in height and prior to flowering (with capitula formed), with doses ranging from 0 to 3 L ha^{-1} . To evaluate herbicide efficacy, plants were cut at ground level 21 days after treatment, and their fresh weight recorded and expressed as a percentage with respect to untreated control plants. Treatments were replicated 4 times in a completely randomized design (each replication with three plants). The same procedure was performed in the additional two growth stages of *C. bonariensis*. The experiments were repeated at least twice.

Dose response curves were determined for each population according to González-Torralva et al. (2010). Data were pooled and fitted to a nonlinear, log-logistic regression model:

$$Y = c + \{(d - c) / [1 + (x / g)^b]\}$$

where Y is the fresh above-ground weight expressed as a percentage of the untreated control, c and d are coefficients corresponding to the lower and upper asymptotes, b is the slope of the line, g is the herbicide rate at the point of inflection halfway between the upper and lower asymptotes, and x (independent variable) is the herbicide dose. Regression analysis was conducted using SigmaPlot for Windows Version 10.0.

Spray retention assays. Plants at BBCH 14-15 scale (Hess et al. 1997) were sprayed with a colored glufosinate solution using the spray chamber and conditions as described in the dose-response assays. Solution contained glufosinate at a rate of 1 L (formulated product) ha^{-1} plus 100 mg L^{-1} Na-fluorescein (Grangeot et al. 2006, Michitte et al. 2007) in an application volume of 300 L ha^{-1} . After the spray had dried on the foliage (15 min.), plants were cut off at ground level and immersed for 30 s in 50 mL of 5 mM NaOH, next the washed solution was filtered and kept in vials. Plants were then placed at 60 °C for 72 h and the dry matter weighed. The amount of Na-fluorescein in each sample was measured by its absorbance with a Hitachi F-2500 Fluorescence Spectrophotometer at 490_{exc}/510_{em} nm. This procedure was carried out with *C. bonariensis* at the different growth stages described. Experiments were arranged in a completely randomized design with four replications (3 plants each) for each population. Results were expressed as mL of spray retention per g^{d} dry weight. The experiments were repeated at least twice.

Statistical analyses. Statistical analyses among the *Conyza* spp. populations were performed using Statistix version 8.0 Analytical Software. Data obtained in spray retention assays were subjected to analysis of variance and means were compared using Tukey's honestly significant difference (HSD) test at the 5% probability level.

Results and discussion

Dose-response assays. Different degrees of sensitivity and control have been found in different species when they are treated with glufosinate (Mersey et al. 1990, Everman et al. 2009). Dose-response assays showed a high susceptibility among the different *Conyza* spp. with differences between species. At 4 days after treatment all the plants showed phytotoxicity symptoms due to the herbicide application.

The dose inhibiting the above-ground biomass by 50% (ED_{50}) decreased in the order: *C. bonariensis* > *C. sumatrensis* > *C. canadensis*. The ED_{50} values found were 0.216; 0.09 and 0.058 L ha^{-1} , respectively (Figure 1). *C. bonariensis* was 3.7 and 2.4 times less susceptible than *C. canadensis* and *C. sumatrensis*, respectively. These results are similar to those reported by Fernandez-Cerejido et al. (2009) whose work with several adjuvants on the effectiveness of *Conyza* spp. reported that *C. albida* showed a higher susceptibility to glufosinate than *C. bonariensis* regardless of the adjuvant.

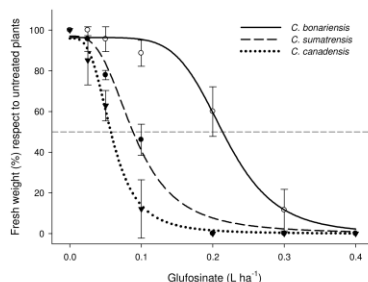


Figure 1. Dose response curves of the three species of *Conyza* spp. Fresh weight was determined 21 days after treatment, data were expressed as percentage with respect to untreated plants. Vertical bars represent \pm standard errors of the mean. Córdoba, Spain, 2011.

At later developmental growth stages in *C. bonariensis*, the dose inhibiting the above ground biomass by 50% increased considerably. ED_{50} showed values of 0.517 and 1.297 L ha^{-1} for the second and third growth stage, respectively (Table 1). Other studies carried out on *A. artemisiifolia* L. showed that the most effective control in this species with glufosinate or glyphosate is at bud appearance (BBCH 53-55) growth stage (Gauvrit and Chauvel 2010). Assays made on different species such as *Amaranthus rudis* Sauer; *Ambrosia trifida* L.; *Ipomoea hederacea* (L.) Jacq.; *Eriochloa contracta* Hitchc.; *Abutilon theophrasti* medicus and *Cyperus esculentus* L.

treated with glufosinate at three different growth stages showed different responses among species, locations and growth stage application. *Ambrosia trifida* L., *Ipomoea hederacea* (L.), and *Eriochloa contracta* Hitchc. showed a major percentage damage when treated at an early growth stage compared to later developmental stages. However, when glufosinate was applied on *A. trifida* L. in another location the visual damage was different, and major injury was obtained when plants were treated at 15 cm in height (Hoss et al. 2003). The differences in sensitivity found in this work could be due to differences in absorption/translocation or metabolism as has been demonstrated in other studies. The study of those techniques requires further investigations.

Table 1. Parameters found in the model^a used to calculate the glufosinate dose required for 50% plant injury (ED₅₀) in *C. bonariensis* plants treated at three different growth stages. Córdoba, Spain, 2011.

Growth stage	c	d	b	ED ₅₀ (L ha ⁻¹)	pseudo r ²	P ^c
Rosette (BBCH 14-15)	0.89	100.00	5.68	0.216	0.97	<0.001
10-15 cm in height	43.54	97.58	3.99	0.517	0.87	<0.001
Capitula formed (prior to flowering)	60.25	95.98	4.28	1.297	0.93	<0.001

^a $Y = c + [(d - c) / (1 + (x / g)^b)]$, where Y is the percent plant injury; x (independent variable) is the herbicide rate; c and d are the lower and upper, asymptote, respectively; b is the slope of the curve; and ED₅₀ is the effective herbicide rate required for 50% plant injury. Data were pooled and fitted to a non-linear regression model. ^b Approximate coefficient of determination of non-linear models with a defined intercept calculated as pseudo r² = 1 - (sums of squares of the regression/corrected total sums of squares). ^c Probability level of significance of the non-linear model.

Spray retention assays. *Conyza canadensis* retained more glufosinate than *C. sumatrensis* and *C. bonariensis*, but there were no significant differences between populations at BBCH 14-15 stage (Table 2). In the second and third growth stage in *C. bonariensis* the values in spray retention decreased, with the values ranging from 0.35 to 0.45 mL spray retention g⁻¹ dry weight. There were no significant differences between those two growth stages, although when compared with the amount retained in the BBCH 14-15 stage there were significant differences.

Species like *Ambrosia artemisiifolia*, *Triticum aestivum* L., *Pisum sativum* L., *Chamomilla recutita* L., *Solanum nigrum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. have shown differences in the amount of spray retention with values ranging from 0.3 to 0.4 mL g⁻¹ dry weight (De Ruiter et al. 1990). In the BBCH 14-15 stage, the data in spray retention are not in accordance with the ED₅₀ values found in the different *Conyza* spp., *C. bonariensis* retained almost the same amount of herbicide solution (with no significant differences), but the ED₅₀ value was higher compared with the other two species. In the other two growth stages of *C. bonariensis* the amount of herbicide retained was similar without significant differences. However, as in the BBCH 14-15 stage, the ED₅₀ values are not in accordance; this could be due to the amount

of herbicide absorption by the plant in the different growth stages, and different factors such as temperature, humidity, spray volume and the plant physiology (Grangeot et al. 2006).

Table 2. Spray retention values obtained with treated plants of *Conyza* spp. in the BBCH 14-15 stage and two additional growth stages in *C. bonariensis*. Córdoba, Spain, 2011.

Species	Stage	mL spray retention g ⁻¹ dry weight ^a
<i>C. canadensis</i>	BBCH 14-15	1.16 ± 0.29 A
<i>C. sumatrensis</i>	BBCH 14-15	0.99 ± 0.17 A
	BBCH 14-15	0.98 ± 0.20 A
<i>C. bonariensis</i>	10-15 cm in height	0.44 ± 0.05 B
	Capitula formed (Prior to flowering)	0.38 ± 0.05 B

^a Mean values within a column followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level as determined by the Tukey HSD test. Coefficient of variation (CV) = 21.64. Mean values ± standard errors of the mean.

Conclusions

Results obtained show the differential response of the three *Conyza* in southern Spain to glufosinate. As demonstrated by the dose response curves, the optimal application timing is in the rosette stage. Investigations are under way to elucidate the physiological factors that could explain this differential response.

References

- Bastida F, Muriel AJ, Menéndez J. 2005. La flora arvense de los cítricos en la Provincia de Huelva. In: Menéndez J, Bastida F, Fernández-Quintanilla C, González JL, Recasens J, Royuela M, Verdú A, Zaragoza C (eds.). Malherbología Ibérica y Magrebi: soluciones comunes a problemas comunes. Huelva, España: Universidad de Huelva. (In Spanish). pp.305-315.
- Bayer E, Gugel KH, Hagele K, Hagenmaier H, Jessipow S, König WA, Zähler H. 1972. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. Helv Chim Acta 55:224-239.
- Bond JA, Walker TW. 2011. Differential tolerance of Clearfield rice cultivars to imazamox. Weed Technol 25:192-197.
- Campos LHF, Francisco MO, Carvalho SJP, Nicolai M, Christoffoleti PJ. 2009. Susceptibility of *Ipomoea quamoclit*, *I. triloba* and *Merremia cissoides* to the herbicides sulfentrazone and amicarbazone. Planta Daninha 27:831-840.
- Carretero JL. 2004. Flora Arvense Española: Las Malas Hierbas de los Cultivos Españoles. Valencia, España: Phytoma España. 754p.
- Carvalho SJP, Buissa JAR, Nicolai M, López-Ovejero RF, Christoffoleti PJ. 2006. Differential susceptibility of *Amaranthus* genus weed species to the herbicides trifloxysulfuron-sodium and chlorimuron-ethyl. Planta Daninha 24:541-548.
- Coetzer E, Al-Khatib K. 2001. Photosynthetic inhibition and ammonium accumulation in palmer amaranth after glufosinate application. Weed Sci 49:454-459.
- De Ruiter H, Uffing AJM, Meinen E, Prins A. 1990. Influence of surfactants and plant species on leaf

- retention of spray solutions. *Weed Sci* 38:567-572.
- Devine MD, Duke SO, Fedtke C. 1993. Inhibition of amino acid biosynthesis. In: *Physiology of Herbicide Action*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. pp.274-275.
- Eubank TW, Poston DH, Nandula VK, Koger CH, Shaw DR, Reynolds DB. 2008. Glyphosate-resistant horseweed (*Coryza canadensis*) control using glyphosate, paraquat, and glufosinate based herbicide programs. *Weed Technol* 22:16-21.
- Everman WJ, Mayhew CR, Burton JD, York AC, Wilcut JW. 2009. Absorption, translocation, and metabolism of ¹⁴C-glufosinate in glufosinate-resistant corn, goosegrass (*Eleusine indica*), Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and Sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Sci* 57:1-5.
- Fernández-Cerejido MC, Bastida F, Menéndez J. 2009. The effect of several adjuvants on glufosinate effectiveness in *Coryza* species. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 74:525-532.
- Ferreira RR, de Oliveira FTR, Delite FS, Azevedo RA, Nicolai M, de Carvalho SJP, Christoffoleti PJ, Figueira AVO. 2010. Differential tolerance of sugarcane varieties to herbicide stress. *Bragantia* 69: 395-404.
- Gauvrit C, Chauvel B. 2010. Sensitivity of *Ambrosia artemisiifolia* to glufosinate and glyphosate at various developmental stages. *Weed Res* 50:503-510.
- González-Torralva F, Cruz-Hipolito H, Bastida F, Müllerer N, Smeda RJ, De Prado R. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Coryza* weed species in Spain. *J Agric Food Chem* 58:4361-4366.
- Grangeot M, Chauvel B, Gauvrit C. 2006. Spray retention, foliar uptake, and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. *Weed Res* 46:152-162.
- Hess M, Barralis G, Bleiholder H, Buhr L, Eggers Th, Hack H, Stauss R. 1997. Use of the extended BBCH scale-general for the descriptions of the growth stages of mono and dicotyledonous weed species. *Weed Res* 37:433-441.
- Holm L, Doll J, Holm E, Pancho J, Herberger J. 1997. *World weeds: natural histories and distribution*. J.Wiley: New York. pp.226-235.
- Hoss NE, Al-Khatib K, Peterson DE, Loughin TM. 2003. Efficacy of glyphosate, glufosinate, and imazethapyr on selected weed species. *Weed Sci* 51:110-117.
- Lea PJ, Joy KW, Ramos JL, Guerrero MG. 1984. The action of the 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry* 23:1-6.
- Mersey BG, Hall JC, Anderson DM, Swanton CJ. 1990. Factors affecting the herbicidal activity of glufosinate-ammonium: absorption, translocation, and metabolism in barley and green foxtail. *Pestic Biochem Physiol* 37:90-98.
- Michitte P, De Prado R, Espinoza N, Ruiz-Santaella JP, Gauvrit C. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Sci* 55:435-440.
- Recasens J, Conesa JA. 2009. Malas hierbas en plántula: guía de identificación. Ediciones de la Universitat de Lleida: Lleida, Spain. pp.143-147.
- Ruiz-Santaella JP, Bastida F, Franco AR, De Prado R. 2006. Morphological and molecular characterization of different *Echinochloa* spp. and *Oryza sativa* populations. *J Agric Food Chem* 54:1166-1172.
- Saavedra MM, Pastor M. 2002. Sistemas de cultivo en olivar (manejo de malas hierbas y herbicidas). Ed. Agrícola Española, Madrid, España. 429p.
- Senseman SA. 2007. *Herbicide handbook*. 9th edition, WSSA, Lawrence, KS 66044-8897, USA. pp.247-248.
- Tachibana K, Watanabe T, Seikizawa Y, Takematsu T. 1986b. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J Pestic Sci* 11:33-37.
- Tachibana K, Watanabe T, Seikizawa Y, Takematsu T. 1986a. Inhibition of the glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos treated Japanese barnyard millet. *J Pestic Sci* 11:27-31.
- Thébaud C, Abbott RJ. 1995. Characterization of invasive *Coryza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *Am J Bot* 82:360-368.
- Wendler C, Barniske M, Wild A. 1990. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 plants. *Photosynth Res* 24:55-61.

Received on January 4, 2012.
Accepted on February 20, 2012.
Online published on February 28, 2012.

Quality of English writing is responsibility of authors.

ANEXO III

C. bonariensis, C. canadensis y C. sumatrensis



Plántulas de *Conyza* spp. en el estadio de roseta. Nótese la morfología diferente de la hoja, así como la coloración y longitud del pedicelo.



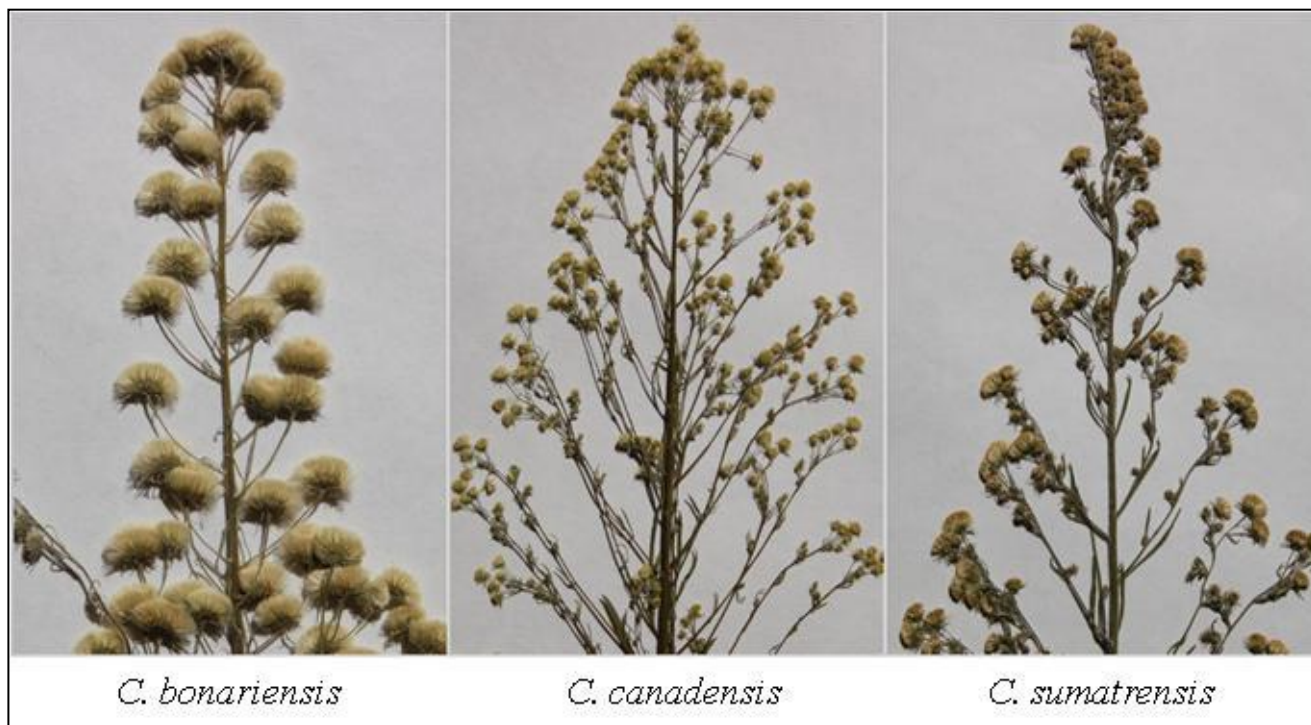
Plantas de *Conyza* spp. en el estadio de roseta: *C. canadensis* (izq.) y *C. bonariensis* (der.).



Planta de *C. sumatrensis* en el estadio de roseta.



Plantas en estadios avanzados de crecimiento. *C. bonariensis* (izq.), *C. canadensis* (centro), *C. sumatrensis* (der.).



Inflorescencias mostrando los capítulos florales de las especies: *C. bonariensis*, *C. canadensis* y *C. sumatrensis*.



Capítulos florales de las tres principales especies de *Conyza* presentes en Andalucía.



Plantas de *C. bonariensis* en un cultivo de olivar (Provincia de Córdoba).



Plantas de *C. canadensis* afectando diferentes cultivos perennes, en cítricos (arriba) y en albaricoque (abajo) (Provincia de Sevilla).



Plantas de *C. sumatrensis* afectando al cultivo de cítricos (Provincia de Huelva).



En muchas ocasiones se puede encontrar conviviendo a ambas especies. En ambas fotos *C. canadensis* (izq.) y *C. bonariensis* (der.) (Provincia de Córdoba).